

**FABIANE GOMES DE MORAES REGO**

**ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENE *rpoN* DE  
*Herbaspirillum seropedicae***

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de doutora pelo curso de Pós-graduação em Ciências, área de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel M. de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio O. Pedrosa

Curitiba

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, pela oportunidade de trabalhar no grupo, exemplo profissional, orientação e críticas.

Aos membros do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio e ao Projeto Genopar que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Aos coordenadores de Pós-graduação, Dr. Leda Satie Chubatsu e Prof. Maria Eugênia Rebelo Duarte, pelo apoio dispensado. À Dona Marilza pelo auxílio e apoio.

Ao Valter, Dona Roseli e Dona Jú pelo auxílio e pela atenção dispensada em todos os momentos.

Agradeço também ao apoio financeiro CAPES, CNPq, FINEP-MCT-PRONEX/96.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	x
<b>RESUMO</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xii
<b>INTRODUÇÃO</b>	01
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	03
1. A proteína RpoN	05
2. Famílias de fatores sigma bacterianas	09
2.1. Família $\sigma^{70}$	10
2.2. Família $\sigma^{54}$	13
2.2.1. Promotores -24/-12	15
2.2.2. Estrutura e função da proteína RpoN	17
2.2.3. Ativação da transcrição dos genes $\sigma^{54}$ -dependentes	21
2.2.4. Proteínas ativadoras de genes $\sigma^{54}$ -dependentes	23
2.2.5. Proteína IHF	26
2.2.6. Vias metabólicas dependentes de $\sigma^{54}$	28
2.2.6.1. Assimilação de nitrogênio	28
2.2.6.1.1. Assimilação de nitrato	29
2.2.6.1.2. Glutamina sintetase	30
2.2.6.1.3. Fixação biológica de nitrogênio	33
2.2.6.1.4. Transporte de amônio	34
2.2.6.1.5. Transporte de aminoácidos	35
2.2.6.2. Transporte de ácidos dicarboxílicos	35
2.2.6.3. Síntese de flagelos	39
2.2.7. Controle dos níveis e atividade de RpoN	39
<b>OBJETIVOS</b>	41

<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	42
1. Reagentes	42
2. Microorganismos e plasmídeos	42
3. Antibióticos	42
4. Meios de cultura	44
5. Purificação de DNA	46
5.1 Mini-preparação de plasmídeo	46
5.2 Maxi-preparação de plasmídeos	47
5.3. Purificação de DNA total de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	47
5.4. Purificação de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão	47
5.5. Purificação de DNA para reação de seqüenciamento	48
6. Eletroforese de DNA em gel de agarose	48
7. Digestão de DNA com enzimas de restrição	49
8. Ligação dos fragmentos de DNA	49
9. Transformação bacteriana por choque térmico de <i>E. coli</i>	50
10. Transformação bacteriana por choque elétrico de <i>E. coli</i> e <i>H. seropedicae</i>	51
11. Conjugação bacteriana	51
12. Sequenciamento de DNA	52
13. Inserção de transposon <i>in vitro</i>	53
14. Hibridização de DNA	53
15. Captação de [ <sup>14</sup> C]metilamônio e amônio	53
16. Crescimento em diferentes fontes de nitrogênio e carbono	54
17. Ensaio de motilidade	54
18. Determinação da atividade de glutamina sintetase (GS)	55
19. Purificação das proteínas RpoN de <i>K. pneumoniae</i> e <i>H. seropedicae</i>	55
20. Ensaio de retardamento eletroforético do <i>pnifB</i> pelas proteínas RpoN e IHF	57
21. Ensaio de proteção com DNase I	58
22. Transcrição "in vitro"	59
23. Outros métodos	59
23.1. Dosagem de proteínas	59
23.2. Quantificação de DNA por espectrofotometria	60
23.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida pesnaturante	60

23.4. Determinação da atividade da nitrogenase	60
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	61
1. Análise do operon <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i>	61
2. Construção e caracterização fisiológica do mutante <i>rpoN</i>	68
2.1. Mutagênese do gene <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i> por inserção de transposon	68
2.2. Análise fisiológica dos mutantes <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i>	71
2.3. Atividade de glutamina sintetase do mutante <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i>	74
2.4. Captação de [ <sup>14</sup> C]metilamônio pelo mutante <i>rpoN</i> e <i>ntrC</i>	75
2.5. Análise “in silico” de promotores $\sigma^{54}$ -dependentes em <i>H. seropedicae</i>	78
3. Caracterização do promotor <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	80
3.1. Função de IHF na transcrição do promotor <i>nifB</i>	80
4. Purificação e caracterização da atividade da proteína RpoN de <i>H. seropedicae</i>	86
4.1. Clonagem do gene <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i> em vetor de expressão	86
4.2. Purificação da proteína RpoN de <i>H. seropedicae</i>	87
4.3. Ensaio de Retardamento em Gel do Complexo Promotor <i>nifB</i> -proteína RpoN-His	89
<b>Considerações finais</b>	92
<b>CONCLUSÕES</b>	94
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	95
<b>ANEXOS</b>	125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Funções e distribuição dos vários fatores sigma ( $\sigma$ )	11
Tabela 2. Seqüências consenso reconhecidas por vários fatores sigma.	14
Tabela 3. Algumas EBPs $\sigma^{54}$ -dependentes e suas funções biológicas	25
Tabela 4. Exemplos de genes $\sigma^{54}$ -dependentes	31
Tabela 5. Famílias de transportadores de C <sub>4</sub> -dicarboxilatos	37
Tabela 6. Estirpes e plasmídeos	43
Tabela 7. Fenótipos das estirpes mutante e selvagem <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i>	72
Tabela 8. Identificação de genes de <i>H. seropedicae</i> que são dependentes do fator $\sigma^{54}$ em outras Proteobacterias	79
Tabela 9. A expressão do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> é estimulada por IHF	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo sigma	07
Figura 2. Representação estrutural e funcional dos fatores sigma das famílias $\sigma^{70}$ e $\sigma^{54}$	19
Figura 3. Modelo esquemático para o mecanismo do início de transcrição pela holoenzima $\sigma^{54}$ RNAP dependente de proteínas ativadoras	22
Figura 4. Organização estrutural do operon <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i>	62
Figura 5. Organização estrutural da região <i>rpoN</i> em diversas espécies bacterianas.	64
Figura 6. Comparação entre as seqüência de aminoácidos das proteínas RpoN de <i>H. seropedicae</i> , <i>Burkholderia fungorum</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i>	66
Figura 7. Alinhamento da seqüência de aminoácidos do motivo HVH	68
Figura 8. Inserção do transposon EZ::TnTET-1 no gene <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i>	69
Figura 9. Análise por hibridização dos transconjugantes de <i>H. seropedicae</i> contendo inserção de transposon no gene <i>rpoN</i>	70
Figura 10. Representação esquemática de inserção de transposon EZ::TnTET-1 no gene <i>rpoN</i>	71
Figura 11. Atividade biossintética da glutamina sintetase nas estirpes selvagem e mutantes <i>rpoN</i> e <i>ntrC</i> de <i>H. seropedicae</i>	75
Figura 12. Captação de [ <sup>14</sup> C]metilamônio pelas estirpes selvagem e mutantes <i>rpoN</i> e <i>ntrC</i> de <i>H. seropedicae</i> crescidas sob limitação de amônio	76



Figura 13. Captação de [ <sup>14</sup> C]metilamônio pelas estirpes mutantes <i>rpoN</i> e <i>ntrC</i> e selvagem de <i>H. seropedicae</i> cultivadas em excesso de íons amônio.	77
Figura 14. Região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	81
Figura 15. Ligação da proteína IHF a região promotora do gene <i>nifB</i>	83
Figura 16. Região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> é protegida pela ligação a IHF	84
Figura 17. Efeito de IHF sobre a transcrição do promotor <i>nifB</i> <i>in vitro</i>	85
Figura 18. Efeito de IHF sobre a ligação da holoenzima ao promotor <i>nifB</i>	86
Figura 19. Perfil eletroforético do produto de PCR para obtenção do gene <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i>	87
Figura 20. Eletroforetograma de proteínas em gel de SDS-PAGE dos extratos livres de células da estirpe de <i>E. coli</i> expressando a proteína RpoN-His de <i>H. seropedicae</i> .	88
FIGURA 21. Efeito da concentração da proteína RpoN na formação do complexo promotor <i>nifB</i> -RpoN-His	89
FIGURA 22. Efeito da concentração da proteína RNA polimerase na formação do complexo promotor <i>nifB</i> -RpoN-His de <i>H. seropedicae</i>	90
FIGURA 23. Efeito da concentração da proteína IHF na formação do complexo Holoenzima RNA polimerase-RpoN-His-promotor <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	91

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Relação filogenética dos fatores sigma da família $\sigma^{70}$	126
Anexo 2. Relação filogenética entre os membros da família $\sigma^{70}$	127
Anexo 3. Relação filogenética da família de carreadores de ácidos C <sub>4</sub> -dicarboxílicos	128

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAA+: Família de ATPases associadas a várias atividades celulares  
ATP: 5' trifosfato de 2' desoxiadenosina  
ATPase: Trifosfatase adenosina  
[ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP: [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] 5' trifosfato de 2' desoxiadenina  
CE: Complexo de elongação  
CA: Complexo aberto  
CTAB: Brometo de cetyltrimetilamônio  
DAACS: Família de carreadores dicarboxilato/aminoácido:cátion simporte  
DASS: Família de carreadores ânion divalente: $\text{Na}^+$  simporte  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
DNTPs: 5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo  
D.O.: Densidade óptica  
E: Núcleo da RNAP  
EBPs: enhancer-binding proteins  
EDTA: Ácido etilenodiamino-tetra-acético  
E $\sigma$ : Holoenzima (Complexo entre RNAP e o fator sigma)  
GS: Glutamina sintetase  
GLU: glutamato  
HVH: hélice-volta-hélice  
IHF: Fator de integração do hospedeiro  
k $\Omega$ : Quilo Ohms  
kb: Quilopares de base  
kDa: Quilo Dalton  
kV: Quilo volts  
L: litro  
Mini-prep: Mini preparação de plamídeos  
ONPG: 0-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo  
Pb: Pares de base  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
RNAP: RNA polimerase  
rpm: Rotações por minuto  
SDS: Dodecilsulfato de sódio  
TRAP: Transportadores periplasmáticos ATP-independente  
Tris: Tris(hidroximetil)-aminometano  
UAS: upstream activator sequence

## RESUMO

A análise da seqüência de aminoácidos deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos do gene *rpoN* (*ntrA*) de *Herbaspirillum seropedicae* corresponde ao fator sigma 54 ( $\sigma^{54}$  ou  $\sigma^N$ ) que apresentou alta similaridade a proteína RpoN de outros membros da família  $\sigma^{54}$ . Em *H. seropedicae*, o gene que codifica para  $\sigma^{54}$  faz parte de um operon constituído de 7 genes, sendo ele o sexto. A organização estrutural deste operon é idêntico ao de *Ralstonia solanacearum* e *Xylella fastidiosa*. O gene *rpoN* de *H. seropedicae* foi mutagenizado por inserção de transposon e a estirpe mutante foi incapaz de utilizar dinitrogênio ou nitrato como fonte única de nitrogênio e de captar [C]metilamônio. Mas, foi capaz de usar ácidos dicarboxílicos. A atividade biosintética da glutamina sintetase da estirpe mutante *rpoN* crescida em condições limitante de íons amônio correspondeu a metade do valor da estirpe selvagem. Para estudar a atividade da proteína RpoN de *H. seropedicae* *in vitro*, o gene foi clonado em vetor de expressão pET28a o qual expressa a proteína RpoN fusionada a uma cauda de histidina (RpoN-His). A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna *HiTrap Chelating*. A proteína RpoN-His ( $\sigma^{54}$ ) de *H. seropedicae* foi capaz de se ligar de forma específica ao promotor do gene *nifB* (promotor tipo -24/-12) em altas concentrações. Contudo, a adição das proteínas RNA polimerase e IHF aumentou a afinidade de  $\sigma^{54}$  ao promotor *nifB*, sugerindo que estas proteínas são necessárias para um eficiente reconhecimento do promotor *nifB* de *H. seropedicae*. Os mesmos resultados foram obtidos quando a proteína RpoN-His de *Klebsiella pneumoniae* foi utilizada. Os fatores sigmas apresentam ao menos duas atividades: (1) reconhecer e ligar-se ao DNA, e (2) interagir com a RNA polimerase. Ambas foram encontradas na proteína RpoN-His *H. seropedicae*.

## ABSTRACT

Analysis of the nucleotide sequence of *rpoN* (*ntrA*) gene encoding the  $\sigma^N$  or  $\sigma^{54}$  or RpoN protein of *Herbaspirillum seropedicae* showed that the amino acid sequence deduced share a high degree of homology with other members of the sigma N family. In *H. seropedicae*, *rpoN* gene is the 6<sup>th</sup> gene of a seven-genes operon. The structural organization of this operon is identical to that of *Ralstonia solanacearum* and *Xylella fastidiosa*. The *rpoN* gene of *H. seropedicae* was knocked out by transposon mutagenesis and the mutant strain was defective in growth using nitrate or dinitrogen as sole nitrogen sources and uptake of [<sup>14</sup>C]methylammonium. In contrast, the *rpoN* mutant was capable to use dicarboxylic acids as sole carbon source. The glutamine synthetase biosynthetic activity of the *rpoN* mutant strain grown under ammonium limiting conditions was half of that of the wild type strain. To study the activities of the RpoN protein of *H. seropedicae* *in vitro* the *rpoN* gene was cloned into the expression vector pET28a that drives the expression of the RpoN protein fused to a N-terminal hexa-histidine tag (RpoN-His). The recombinant protein was purified by affinity chromatography on a HiTrap Chelating column. The RpoN-His ( $\sigma^N$ ) of *H. seropedicae* was capable of binding specifically to the *nifB* promoter (-24/-12 type promoter) at high concentrations. However, addition of the core RNA polymerase and IHF protein increased the affinity for the *nifB* promoter, suggesting that these proteins are necessary for efficient recognition of the *nifB* promoter in *H. seropedicae*. The same results were obtained when the RpoN-His protein of *Klebsiella pneumoniae* was used. Sigma factors have at least two activities: (1) DNA recognition and DNA binding, and (2) interaction with core RNA polymerase. Both activities were observed in the RpoN-His protein of *H. seropedicae*.

## INTRODUÇÃO

Os organismos mais estudados em termos de fixação biológica de nitrogênio pertencem às subclasses  $\gamma$  (*Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*) e  $\alpha$  (*Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azorhizobium caulinodans*) das Proteobacterias. *Herbaspirillum seropedicae*, que pertence à subclasse  $\beta$ , constitui um novo modelo para o estudo da fixação de nitrogênio (DÖBEREINER, 1992; MERRICK, 1992; YOUNG, 1992; FISCHER, 1994; PEDROSA et al., 2001).

Em *H. seropedicae*, da mesma forma que em outros diazotrofos, os promotores dos genes *nif* (*nifB*, *nifHDK*) pertencem à classe de promotores de procariotos que requerem o fator  $\sigma^{54}$  (MERRICK, 1992; MACHADO et al., 1996; PEDROSA et al., 1997).

O fator  $\sigma^{54}$ , também conhecido como fator  $\sigma^N$  ou proteína RpoN, é um fator sigma alternativo da RNA polimerase de procariotos de características únicas e com pouca ou nenhuma semelhança estrutural com outros fatores sigma conhecidos (WÖSTEN, 1998). O gene que codifica esta proteína foi descrito por Garcia e colaboradores (1977) e foi denominado *glnF* (também chamado de *ntrA* por estar envolvido na regulação do metabolismo de nitrogênio). Em Proteobactérias a baixa disponibilidade de nitrogênio fixado leva à expressão de um conjunto de genes envolvidos com a captação de fontes alternativas de nitrogênio. A maior parte destes tem sua transcrição dependente, direta ou indiretamente, do fator  $\sigma^{54}$  (KUSTU et al., 1989). Até 1986 acreditava-se que o fator  $\sigma^{54}$  da RNAPolimerase estivesse envolvido apenas no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio, incluindo capacidade de utilização de nitrato e alguns aminoácidos como fonte de nitrogênio e na fixação de nitrogênio. Posteriormente, demonstrou-se o seu envolvimento na expressão de proteínas do metabolismo de compostos aromáticos de *Pseudomonas putida* (DIXON, 1986), do transportador de dicarboxilatos em *Sinorhizobium meliloti* (RONSON et al., 1987a), enzimas do metabolismo anaeróbico de *E. coli* (BIRKMANN, SAWERS & BOCK, 1987).

Uma vez que a subunidade  $\sigma$  da RNA polimerase é responsável pelo reconhecimento e ligação ao promotor, as seqüências promotoras reconhecidas pela RNA polimerase associada aos diversos fatores sigma são diferentes. A  $\sigma^{54}$ RNA polimerase reconhece a seqüência consenso TGGCAC-N<sub>5</sub>-TTGCA/T, que possui os nucleotídeos

GG e GC, quase que invariavelmente conservados nas posições -25/-24 e -13/-12, respectivamente (HUNT & MAGASANIK, 1985; KUSTU et al., 1989). O início de transcrição a partir de promotores dependentes da holoenzima  $\sigma^{54}$ RNA polimerase é absolutamente dependente de uma proteína ativadora de transcrição específica que responde a variações metabólicas e determina os níveis de expressão dos genes sob seu controle (SHINGLER, 1996).

Em todos os organismos estudados, o fator  $\sigma^{54}$  está envolvido com a expressão de genes necessários para a utilização de fontes alternativas de nitrogênio. Entretanto, considerando que, em muitos organismos, o fator  $\sigma^{54}$  também está envolvido na metabolização de compostos de carbono (RONSON, ASTWOOD & DOWNIE, 1984; RONSON et al., 1987a; RONSON et al., 1987b; ROMERMMAN et al., 1989) e motilidade (MINNICH & NEWTON, 1987; TOTTEN, LARA & LORY, 1990; MILCAMPs et al., 1996), é possível que esta proteína possa fazer parte de um mecanismo de integração do metabolismo de carbono e nitrogênio (KUSTU et al., 1989; REITZER & SCHNEIDER, 2001).

Assim, este projeto teve por objetivo investigar a função do fator  $\sigma^{54}$  na assimilação de fontes alternativas de nitrogênio e carbono, na motilidade em *H. seropedicae* e ensaiar a atividade da proteína RpoN de *H. seropedicae*.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O nitrogênio é um nutriente essencial para os seres vivos. Na forma de nitrogênio molecular ou dinitrogênio ( $N_2$ ), que corresponde a 80% (v/v) da atmosfera, é metabolicamente indisponível para todos os organismos eucarióticos. Entretanto, algumas espécies de microrganismos podem converter o dinitrogênio atmosférico a íons amônio pela ação da enzima nitrogenase, em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio. Estes microrganismos capazes de fixar nitrogênio são chamados de diazotrofos (van BERKUM & BOHLOOL, 1980; POSTGATE, 1982a; POSTGATE, 1998, DIXON & KAHN, 2004).

Fixação de nitrogênio e crescimento diazotrófico é encontrada somente em procariotos, mais amplamente distribuída entre Bacteria e restritamente em Archaea (DIXON & KAHN, 2004). A capacidade de fixar nitrogênio é compatível com uma variedade de condições fisiológicas, incluindo heterotrofia aeróbica (*Azotobacter*), micro-aerófila (*Herbaspirillum*), anaeróbica facultativa (*Klebsiella*), anaeróbica (*Clostridium*), fototrofia oxigênica (*Anabaena*) ou anaeróbica (*Rhodobacter*) e quimiolitotrofia (*Leptospirillum ferrooxidans*) (POSTGATE, 1982b; POSTGATE, 1998; DIXON & KAHN, 2004). Diazotrofos são encontrados em uma variedade de habitat, incluindo solo (*Azotobacter*) e água (*Enterobacter*), na forma livre ou em associação com plantas como a simbiose em nódulo de raízes de leguminosas (*Rhizobium*), simbiose actino-rízica (*Frankia*), simbiose de cianobactéria (*Nostoc*), associação endofítica (*Herbaspirillum*) e associações causais com raízes (*Azospirillum lipoferum*), com folha (*Klebsiella*), destrutiva (*Citrobacter*) e com animais (*Azoarcus*) (POSTGATE, 1998; DIXON & KAHN, 2004).

As plantas superiores e animais obtêm compostos nitrogenados primariamente gerados por microrganismos fixadores ou de fertilizantes químicos. Ocorre ainda uma pequena taxa de fixação de nitrogênio atmosférico catalisada por descargas elétricas (POSTGATE, 1982a). Porém, o nitrogênio disponível no solo não supre a demanda da produtividade agrícola atual, o que levou ao aumento exponencial da utilização de fertilizantes químicos nitrogenados, principalmente na forma de nitrato, nas últimas quatro décadas (van BERKUM & BOHLOOL, 1980; PEDROSA, 1987). A utilização indiscriminada de compostos nitrogenados na agricultura é dispendiosa e traz riscos consideráveis. Além de constituir uma grande interferência humana no ciclo de



nitrogênio, aumenta a emissão de óxido de nitrogênio, a acidificação do solo e a eutroficação da água (van BERKUM & BOHLOOL, 1980; POSTGATE, 1982a; PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1992; DÖBEREINER 1997; DIXON & KAHN, 2004).

Uma alternativa mais barata e ecologicamente aceitável ao uso de fertilizantes nitrogenados é o uso da fixação biológica de nitrogênio. Como exemplo, a cultura de soja pode ser inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* que faz uma associação simbiótica altamente produtiva, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. Calcula-se que apenas no Brasil cerca de 3 bilhões de dólares são economizados em fertilizantes nitrogenados graças a fixação de nitrogênio de *Bradyrhizobium* associado a soja (PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1997).

Embora a simbiose *B. japonicum*-soja seja o caso ainda mais claro dos benefícios econômicos e ambientais da utilização da fixação de nitrogênio, diazotrofos de vida livre como o *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum spp.* e *Herbaspirillum spp.* têm sido encontrados em tecidos vasculares de cana-de-açúcar, sugerindo uma associação endofítica (BALDANI et al., 1992; OLIVARES et al., 1996; BALDANI & BALDANI, 2005). Estes achados sugerem uma explicação para o fato de áreas de culturas de cana-de-açúcar permanecerem produtivas por décadas ou séculos sem exaustão das reservas de nitrogênio do solo ou declínio de produtividade. Pelo menos para certas variedades de cana-de-açúcar, a fixação biológica de nitrogênio parece ser suficiente para garantir uma produção duradoura (DÖBEREINER, 1993; FRANCO & DÖBEREINER, 1994; BODDEY et al., 1995; DÖBEREINER, 1997).

Além disso, uma grande variedade de cereais capazes de serem colonizados por diazotrofos endofíticos foi identificada e já foi demonstrado que estas culturas utilizam fertilizantes nitrogenados em uma taxa inferior ao seu requerimento teórico (DÖBEREINER, 1992; DÖBEREINER, 1997; BALDANI & BALDANI, 2005). Várias espécies de microrganismos foram isoladas, especialmente *Herbaspirillum spp.*, *Burkholderia spp.* e certas estirpes de *Azospirillum spp.*, de raízes, caules e folhas de milho, *Pennisetum*, arroz, trigo, abacaxi e banana (BALDANI, BALDANI & DÖBEREINER, 1986; BALDANI et al., 1986; BALDANI, BALDANI & DÖBEREINER, 1987; DÖBEREINER, 1992; BODDEY et al., 1995; DÖBEREINER, 1997; CRUZ et al., 2001; RONCATO-MACCARI et al., 2003; BALDANI & BALDANI, 2005).

Todas estas observações indicam que pelo menos uma parte dos fertilizantes nitrogenados pode ser substituída pela fixação biológica de nitrogênio no cultivo de gramíneas (DÖBEREINER, 1992). Embora esta alternativa biológica possua vantagens ecológicas e econômicas, incorre em penalidades fisiológicas devido ao processo ser dependente de energia e sensível ao oxigênio (PEDROSA, 1987; DIXON & KAHN, 2004).

A fixação biológica de nitrogênio é um processo que demanda energia porque a nitrogenase ao reduzir 1 mol de N<sub>2</sub> à amônia consome 16 mol de ATP e quatro pares de elétrons (MERRICK, 1992; DIXON & KANH, 2004). Devido ao alto custo energético, os diazotrofos regulam fortemente tanto a síntese quanto a atividade da nitrogenase em resposta a vários fatores ambientais. Devido à alta sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio, a tensão de oxigênio ambiental constitui o principal fator regulatório da fixação de nitrogênio para muitos diazotrofos. A disponibilidade de nitrogênio fixado é um outro fator regulatório importante para os diazotrofos de vida livre, porém de pouca importância para os associativos que são capazes de exportar o nitrogênio fixado para o hospedeiro. A regulação da fixação de nitrogênio pode ocorrer por diversos mecanismos, mas em todos os organismos estudados sempre é exercida principalmente ao nível de transcrição dos genes de fixação de nitrogênio (*nif*) (DIXON et al., 1980; MERRICK, 1992). Em *H. seropedicae* como em outros diazotrofos, a ativação da expressão dos genes *nif* é dependente de NifA e RpoN (MERRICK, 1992; MACHADO et al., 1996; SOUZA et al., 2000; PEDROSA et al., 2001; DIXON & KAHN, 2004). A proteína NifA é um ativador transcricional *nif* específico e RpoN é um fator sigma da RNA polimerase (de BRUIJN & AUSUBEL, 1983; HIRSCHMAN et al., 1985; HUNT & MAGASANIK, 1985).

## 1. A proteína RpoN

A primeira etapa da expressão gênica é o evento de início da transcrição, um processo constituído de muitas etapas, catalisado pela holoenzima RNA polimerase (REZNIKOFF et al., 1985). A região regulatória a montante de todos os genes ou operons, designada de promotor, é a seqüência de DNA que é reconhecida de forma específica pela RNA polimerase para iniciar a transcrição (BARRIOS, VALDERRAMA & MORETT, 1999). A RNA polimerase bacteriana é uma enzima heterodimérica constituída por quatro subunidades na estequiometria  $\beta\beta'\alpha_2$

(BURGESS, 1969; HELMANN & CHAMBERLIN, 1988; ISHIHAMA, 2000). Somente quando a RNA polimerase está ligada à subunidade sigma é capaz de reconhecer a seqüência promotora (BURGESS et al., 1969; HELMANN & CHAMBERLIN, 1988; WÖSTEN, 1998). A RNA polimerase ligada ao fator sigma forma a holoenzima. Os fatores sigma dissociáveis direcionam os aspectos principais do processo de iniciação, incluindo reconhecimento do promotor e fusão da fita de DNA para expor o sítio de início de transcrição (HELMANN & CHAMBERLIN, 1988; WÖSTEN, 1998; MOONEY, DARST & LANDICK, 2005).

Uma vez que o número de moléculas de RNA polimerase (RNAP) por célula é inferior ao número de genes, deve haver uma escolha de quais genes devem ser transcritos e com que freqüência (ISHIHAMA, 1981; BLATTNER et al., 1997; ISHIHAMA, 2000). Como a substituição do fator sigma constitui a maneira mais eficiente de alterar as propriedades de reconhecimento das seqüências promotoras pelo aparato de transcrição, acredita-se que a substituição de uma das espécies sigma associada à RNAP por outra constituiria o principal mecanismo para a troca de padrão de transcrição (ZHOU, WALTER & GROSS, 1992; FAREWELL, KVINT & NYSTRÖM, 1998; ISHIHAMA, 2000). A reversibilidade de ligação entre a RNA polimerase e os fatores sigma permite a formação de diferentes holoenzimas capazes de distinguir grupos de promotores necessários para diferentes funções celulares (TRAVERS & BURGESS, 1969, BUCK et al., 2000). Neste processo, originalmente descrito como ciclo sigma ( $\sigma$ ) (Figura 1), o fator sigma se associa a RNAP para coordenar a iniciação e então se dissocia após a transição para o estável complexo de alongamento (CAL) (TRAVERS & BURGESS, 1969; MOONEY, DARST & LANDICK, 2005). Quando a RNAP termina a transcrição e libera DNA e RNA, está livre para se ligar a um novo fator sigma e iniciar um novo ciclo de transcrição. Este ciclo permite que a RNAP ligue-se rapidamente a diferentes fatores sigma em um novo ciclo de transcrição.

Assim, a alteração do padrão de expressão gênica durante o desenvolvimento celular, diferenciação ou em resposta as mudanças no ambiente pode ser obtido através da reprogramação da RNAP, pela troca do fator sigma (MOONEY & LANDICK, 2003, MOONEY, DARST & LANDICK, 2005). Acredita-se que a seleção entre os fatores sigma pela RNAP poderia ser mediada pela competição concentração-dependente dos fatores sigma pelas moléculas disponíveis de RNAP (ZHOU, WALTER & GROSS, 1992; HICKS & GROSSMAN, 1996; FAREWELL, KVINT & NYSTRÖM, 1998;

GROSS et al., 1998; KOLESKY et al., 1999; ISHIHAMA, 2000; MAEDA, FUJITA & ISHIHAMA, 2000). A concentração dos fatores sigma disponíveis é altamente regulada através de sua taxa de expressão, sua taxa de degradação e seqüestro pela ligação a proteínas inibitórias denominadas de fatores anti-sigma (ISHIHAMA, 2000).

Figura 1. O ciclo sigma da RNA polimerase em bactérias

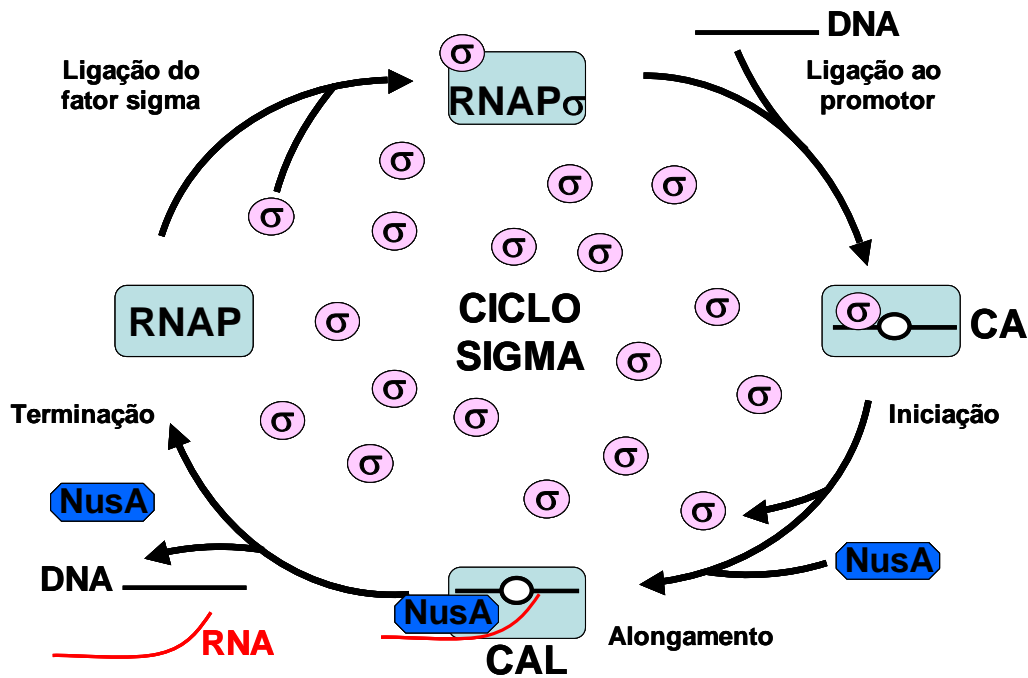


Fig. 1. O conjunto de fatores sigma ( $\sigma$ ) compete pela ligação à RNA polimerase (RNAP) para formar a holoenzima ( $\sigma$ RNAP), a qual se liga a região promotora de DNA para formar um complexo aberto (CA). O fator sigma é liberado durante a fase de alongamento da enzima explicando como pode ser reutilizado diretamente para início de transcrição por múltiplas moléculas da RNAP. Ligação competitiva ao complexo de alongamento (CAL) por NusA pode auxiliar no deslocamento do fator sigma do CAL.

Fonte: MOONEY, DARST & LANDICK, 2005

O ciclo  $\sigma$  é suportado por inúmeras evidências bioquímicas. TRAVERS e BURGESS (1969) demonstraram através de experimentos de transcrição *in vitro* que uma molécula de fator sigma poderia promover a iniciação de cinco ou mais moléculas de RNAP, fato que só poderia ser explicado pela reciclagem do fator sigma. Em 1991, Gill e colaboradores demonstraram que em *E. coli* a afinidade de  $\sigma^{70}$  entre a RNAP e o complexo de alongamento era diminuída pela presença da proteína reguladora de alongamento NusA. Desta forma, o fator sigma liga-se fortemente a RNAP livre permitindo o reconhecimento do promotor e iniciação, mas é liberado de forma estocástica ou logo após a RNAP liberar o promotor (SHIMAMOTO, KAMIGOCHI &

UTIYAMA, 1986). Isto ocorre devido à diminuição da afinidade do fator sigma pela RNAP, uma vez que a cadeia de RNA nascente (>8 nucleotídeos) compete com o fator sigma pelos sítios da RNAP (KRUMMEL & CHAMBERLIN, 1989; DAUBE & von HIPPEL, 1999; MURAKAMI et al., 2002). O fator de alongamento NusA assiste a liberação do fator sigma também por ligação competitiva (GILL et al., 1991).

Alguns estudos têm proposto uma revisão do ciclo  $\sigma$ , sugerindo que os fatores sigma poderiam influenciar etapas durante o alongamento, através de associação transitória (RING, YARNELL & ROBERTS, 1996; KO et al., 1998; MOONEY & LANDICK, 2003; NICKELS et al., 2004; BRODOLIN et al., 2004; KAPANIDIS et al., 2005) ou persistente com o complexo de alongamento (BAR-NAHUM & NUDLER, 2001; MUKHOPADHYAY et al., 2001) ou ainda alterações conformacionais persistentes no complexo de alongamento após a liberação do fator sigma (BERGHOFER-HOCHHEIMER, LU & GROSS, 2005). Tais efeitos permitiriam que o fator sigma regulasse outras etapas da transcrição além da iniciação. Após uma análise mais profunda destes dados, Mooney, Darst e Landick (2005) concluíram que de modo geral o fator sigma é liberado do complexo de alongamento de maneira estocástica, mas em alguns casos não é obrigatória. Também foi demonstrado o papel regulatório dos fatores sigma na fase de alongamento através da estimulação de pausa da transcrição pela sua retenção durante o processo de alongamento ou nova ligação, ou como um anti-terminador. Desta forma mecanismos especializados que governam a liberação, retenção ou ligação de novo poderiam constituir formas de regular a expressão gênica. Estes papéis regulatórios na etapa de alongamento encontrados para os fatores sigma sugerem não só a reversibilidade de ligação proposta pelo ciclo  $\sigma$ , mas também a associação persistente a RNAP proposta por Bar-Nahum e Nudler (2001).

Embora a holoenzima ( $\sigma$ RNAP) determine o padrão de expressão gênica, são necessários fatores regulatórios adicionais para determinar o nível de transcrição, uma vez que a  $\sigma$ RNAP sozinha só é capaz de reconhecer promotores de genes que são constitutivamente expressos e de iniciar a transcrição em taxa constante (ISHIHAMA, 1988; ISHIHAMA, 2000). Os fatores transcricionais determinam a eficiência de iniciação, através de efeitos inibitórios ou estimulatórios. A maioria deles são proteínas ligadoras de DNA, que inibem ou ativam a transcrição de genes específicos, interagindo diretamente com a RNAP e modulando a taxa de início de transcrição e, em alguns, casos a de alongamento. Dessa forma, a especificidade de transcrição da RNAP é

regulada por interação molecular com: 1) o fator sigma, e 2) com os fatores transcricionais, usualmente ligados ao DNA (ISHIHAMA, 2000).

A seqüência de bases e a conformação do DNA na região promotora determinam a freqüência com que a holoenzima iniciará a transcrição (força do promotor) (von HIPPEL et al., 1984; McCLURE, 1985; WÖSTEN, 1998; ISHIHAMA, 2000). Os fatores sigma reconhecem a região promotora através de duas seqüências conservadas denominadas de seqüência promotora consenso (HARLEY & REYNOLDS, 1987).

## 2. Famílias de fatores sigma bacterianas

Além do mais abundante fator sigma, o fator sigma 70 ou proteína RpoD, as bactérias gram-positivas e negativas empregam fatores sigma alternativos (KUSTU et al., 1989). Baseando-se na similaridade de seqüências, duas famílias de fatores sigma foram identificadas: a família  $\sigma^{70}$  e a família  $\sigma^{54}$  (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIAN, 1987; SASSE-DWIGHT & GRALLA, 1990).

A maioria dos fatores sigma em bactérias pertence à família  $\sigma^{70}$ . Esta família recebe esta designação por seu relacionamento estrutural com o principal fator sigma de *E. coli*,  $\sigma^{70}$  (LONETTO, GRIBSKOV & GROOS, 1992; WÖSTEN, 1998). Todas as bactérias contêm um ou mais fatores sigma pertencentes à família  $\sigma^{70}$ , a qual é subdividida em diversos grupos.

Muitas bactérias também contêm um fator ou mais fatores sigma pertencentes à família  $\sigma^{54}$  (MERRICK, 1993; KULLIK et al., 1991), que são similares à subunidade sigma de *E. coli* de 54 kDa (LONETTO, GRIBSKOV & GROOS, 1992). A família  $\sigma^{54}$  contém apenas um grupo de fatores sigma ( $\sigma^{54}$ ), o qual não é essencial em determinadas condições de crescimento (WÖSTEN, 1998).

Por razões históricas a nomenclatura da superfamília  $\sigma$  é complexa. Em *E. coli* e outras bactérias gram-negativas, os genes que codificam para os fatores  $\sigma$  são designados por *rpo* (**R**NA **p**olimerase subunit), enquanto que em bactérias gram-positivas, *sig* (**s**igma). A designação das proteínas é feita através do símbolo  $\sigma$  contendo na forma sobrescrita o nome do gene que a codifica, a sua massa molecular ou uma letra arbitrária. Este tipo de identificação resulta em fatores sigma similares com diferentes nomes e diferentes fatores sigma com o mesmo nome (WÖSTEN, 1998; PAGET & HELMANN, 2003). Além disso, em uma era pós-genômica isto pode resultar em

situações complicadas, como a existência de organismos com um número de fatores  $\sigma$  superior às letras do alfabeto (PAGET & HELMANN, 2003).

## 2.1. Família $\sigma^{70}$

As proteínas da família  $\sigma^{70}$  podem se divididas em três grupos funcionalmente diferentes e estruturalmente relacionados (Anexo 1, Tabela 1) (LONETTO, GRIBSKOV & GROOS, 1992; WÖSTEN, 1998). Enquanto que a função dos fatores  $\sigma$  do grupo 1 é a de dirigir a transcrição em geral dos genes de manutenção/sobrevivência (“house-keeping genes”), os pertencentes aos grupos 2 e 3 são requeridos para a transcrição de genes específicos em resposta a sinais apropriados. Suas funções podem ser divididas em três grandes categorias: resposta a estresses, desenvolvimento e metabolismo auxiliar (PAGET & HELMANN, 2003). O grupo 1 compreende fatores sigma primários que são responsáveis pela transcrição da maioria dos genes expressos nas células em crescimento exponencial e que na sua maior parte são indispensáveis para a sobrevivência celular. O grupo 2 é constituído pelos fatores sigma que são muito similares em seqüência com os primários, mas não essenciais para o crescimento celular. O terceiro grupo consiste dos fatores sigma denominados de alternativos. Este grupo difere consideravelmente da seqüência de aminoácidos dos fatores sigma primários e controlam a transcrição de regulons específicos (LONETTO, GRIBSKOV & GROOS, 1992; WÖSTEN, 1998).

Mais recentemente, os fatores sigma que apresentam função extra-citoplasmática, deixaram de fazer parte de um subgrupo do grupo 3 e passaram a constituir um 4º grupo (Anexo 2) (PAGET & HELMANN, 2003).

Enquanto que a maioria das bactérias apresenta um único fator sigma primário, o número de membros de outros grupos pode variar, refletindo em parte diferenças fisiológicas e desenvolvimento característico dos organismos. Por exemplo, enquanto *E. coli* possui 2 membros de cada um dos grupos 3 e 4, *Streptomyces coelicolor*, por apresentar fisiologia e desenvolvimento complexo, possui 10 membros do grupo 3 e 49 do 4, e *Mycoplasma pneumoniae* não apresenta fatores sigma alternativos (HIMMELREICH et al., 1996; BENTLEY et al., 2002; PAGET & HELMANN, 2003).

Tabela 1. Funções e distribuição dos vários fatores sigma ( $\sigma$ ):

GRUPO	ORGANISMOS E FATORES $\sigma$	FUNÇÕES	REF <sup>a</sup>
1. Fatores $\sigma$ primários:	Bactéria gram-negativas: $\sigma^{70}$ ; bactéria gram-positivas: $\sigma^A$ ; <i>Mycobacteria</i> : MysA; <i>Streptomyces</i> : HrdB	Principais fatores $\sigma$ no crescimento celular exponencial, reguladores dos genes mantenedores.	1
2. Fatores semelhantes aos primários não essenciais:			
2.1. Fatores $\sigma$ de fase estacionária	Enterobacteria, <i>Pseudomonas</i> , RpoS	Principal fator $\sigma$ durante a entrada na fase estacionária. Reguladores globais da expressão de genes na célula exposta ao estresse ácido ou hiper-osmótico.	2
2.2. Fatores $\sigma$ de cianobactérias	<i>Synechococcus</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Anabaena</i> , SigB-E.	Controle da expressão gênica durante respostas circadianas, disponibilidade de carbono e nitrogênio ou fase de crescimento pós-exponencial.	1, 3
2.3. Fatores $\sigma$ de bactérias gram-positivas com alto conteúdo de GC	<i>Mycobacteria</i> , MysB; <i>Corynebacteria</i> , SigB; <i>Streptomyces</i> , HrdA, HrdC-E	Desconhecida.	1
3. Fatores $\sigma$ alternativos:			
3.1. Fatores $\sigma$ flagelares	Enterobacteria, $\sigma^{28}$ ; <i>Streptomyces</i> , WhiG; <i>Bacillus subtilis</i> , $\sigma^D$	Expressão de quimiotaxia, flagelos posteriores ou genes esporulação inicial.	4,5
3.2. Fatores $\sigma$ com função extra-citoplasmática	<i>P. aeruginosa</i> , AlgV; <i>E. coli</i> , FecI; <i>P. fluorescens</i> , PbnA; <i>Myxococcus xanthus</i> CarQ; <i>S. coelicolor</i> , <i>E. coli</i> , <i>mycobacteria</i> , $\sigma^E$ ; <i>P. seyringal</i> , HprL; <i>Alcaligenes eutrophus</i> , CrnH; <i>B.subtilis</i> , SigV-Z	Expressão de genes envolvidos em biossíntese de alginatos, captação de ferro, biossíntese de carotenos, produção de antibióticos, indução de fatores de virulência, resistência ao cobalto e níquel, proteínas de membrana externa ou sobrevivência a altas temperaturas.	6
3.3. Fatores $\sigma$ de choque térmico			
3.3.1. Sigma 32 e relacionados	Bactéria Gram -, $\sigma^{32}$ , <i>M. xanthus</i> ,	Expressão de genes durante o estresse, formação de corpos	7, 8, 9



	SigB; <i>S. aurantiaca</i> , SigC;	de frutificação ou maturação de myxosporos.	
3.3.2. Sigma B e relacionados	<i>B. subtilis</i> , <i>Staphylococcus</i> , $\sigma^B$ ; <i>Mycobacteria</i> , <i>Streptomyces</i> , SigF	Expressão de genes durante o estresse ou esporulação tardia	10 11 12
3.4. Fatores $\sigma$ de esporulação:			
3.4.1. Sigma H	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , $\sigma^H$	Transcrição de genes de esporulação inicial e fase de crescimento exponencial.	13, 14
3.4.2. Sigma F	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , $\sigma^F$	Transcrição de genes de esporos imaturos iniciais.	13, 14
3.4.3. Sigma E	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , $\sigma^E$	Transcrição de genes iniciais de célula mãe.	13, 14
3.4.4. Sigma G	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , $\sigma^G$	Transcrição de genes de imaturos tardios.	13, 14
3.4.5. Sigma K	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , $\sigma^K$	Transcrição de genes de célula mãe tardios.	13, 14
4. Família Sigma 54:	<i>Rhizobium</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Enterobacteriocal</i> , $\sigma^N$	Expressão de genes envolvidos em fixação de nitrogênio, utilização de nitrato, glutamina sintetase, transporte de ácidos, degradação de xileno, síntese de flagelos e fímbrias, produção de levanase.	15

<sup>3</sup>Referências bibliográficas correspondentes aos números são: 1. GRUBER & BRYANT, 1997; 2. LOEWEN & HENGGE-ARONIS, 1994; 3. CASLAKE, GRUBER & BRYANT, 1997; 4. HELMANN, 1991; 5. KELEMEN et al., 1996; 6. LONETTO et al., 1994; 7. YURA, NAGAI & MORI, 1993; 8. NAKAHIGASHI, YANAGI & YURA, 1995; 9. KENNEY & MORAN, 1991; 10. HECKER, SCHUMANN & VOLKER, 1996; 11. DeMAIO et al., 1996; 12. POTUCKOVA et al., 1995; 13. HALDENWANG, 1995; 14. SAUER et al., 1995 e 15. MERRICK, 1993.

Fonte: WÖSTEN, 1998

Membros da família  $\sigma^{70}$  direcionam a especificidade da RNAP a elementos promotores que usualmente apresentam 5 a 6 pares de base (pb) e encontram-se 10 e 35 pb (posição -10/-35) a montante ao sítio de início de transcrição (Tabela 2) (PAGET & HELMANN, 2003).

## 2.2. Família $\sigma^{54}$

A subunidade  $\sigma^{54}$  (RpoN, NtrA,  $\sigma^{54}$  ou  $\sigma^N$ ), codificada pelo gene *rpoN* (*glnF* ou *ntrA*), apresenta ampla distribuição entre as bactérias, tendo sido originalmente identificada em bactérias entéricas como um componente de um circuito global de resposta a concentração de nitrogênio celular (MAGASANIK, 1982; De BRUIJN & AUSUBEL, 1983; HUNT & MAGASANIK, 1985; MERRICK, 1993). Em *Klebsiella pneumoniae* e outros diazotrofos, vários operons envolvidos tanto na assimilação como na fixação de nitrogênio estão sujeitos ao controle de  $\sigma^{54}$  (MERRICK, 1992).

Desde então, têm sido encontradas múltiplas funções fisiológicas reguladas pelo fator  $\sigma^{54}$  em bactérias (KUSTU et al., 1989). Dentre estas funções encontram-se: transporte de ácidos dicarboxílicos (RONSON et al., 1987a), síntese de hemoaglutininas (ROMEU & ZUSMAN, 1987), degradação de compostos aromáticos (DIXON, 1986), formação de flagelos (ISHIMOTO & LORY, 1989; JAGANNATHAN, CONSTANTINIDOU & PENN, 2001) e utilização de formiato (BIRKMANN, SAWERS & BOCK, 1987).

Desta forma, diferente dos outros fatores sigma alternativos,  $\sigma^{54}$  é necessário para a transcrição de genes cujos produtos possuem diversas funções (Tabela 1) (KUSTU et al., 1989).

A região promotora dos genes  $\sigma^{54}$ -dependentes apresentam uma seqüência consenso conservada (5'-TGGCAC-N<sub>5</sub>-TTGCA/T-3') localizada entre as posições -26 e -11 (posições relativas ao início de transcrição), ao invés da seqüência canônica -35/-10 encontrada em genes transcritos pela holoenzima RNA polimerase contendo o fator  $\sigma^{70}$  ( $E\sigma^{70}$ ) (Tabela 2) (MORETT & BUCK, 1989). A designação promotor -24/-12 se deve aos nucleotídeos GG e GC altamente conservados nas posições -25/-24 e -13/-12, respectivamente (FISCHER, 1994).

Tabela 2. Seqüências consenso reconhecidas por vários fatores sigma:

FAMÍLIA		SEQÜÊNCIA CONSENSO <sup>b</sup>			REFERÊNCIA
Família $\sigma^{70}$	NOME <sup>a</sup>	-35	ESPAÇO	-10	
Fatores $\sigma$ primários	$\sigma^{70}$ , RpoD, SigA	TTGACA	16-18	TATAAT	HARLEY & REYNOLDS , 1987; HELMANN, 1995; GRAVES & RABINOWITZ, 1986
Fatores $\sigma$ primários não essenciais					
2.1. Fator $\sigma$ fase estacionária	$\sigma^{38}$ , $\sigma^S$ , RpoS				ESPINOSA-URGEL, CHAMIZO & TORMO, 1996 GILMAN, WIGGS & CHAMBERLIN, 1981
Fatores $\sigma$ alternativos					
3.1. Fator $\sigma$ flagelar	$\sigma^{28}$ , FliA, SigD	TAAA	15	GCCGATAA	HELMANN, 1991
3.2. Fator $\sigma$ flagelar FEC	$\sigma^E$ , SigE	GAACCTT	16-17	TCTRA	LONETTO et al., 1994; MARTIN et al., 1994; RAINA et al., 1995; ROUVIERE et al., 1995
3.3. Fator $\sigma$ choque térmico	$\sigma^{32}$ , RpoH $\sigma^B$ , SigB	GTTGAAA GTTTAA	11-16 12-14	CCCATnT GGGTAT	COWING et al., 1985 HECKER, SCHUMANN & VOLKER, 1996
3.4. Fator $\sigma$ esporulação	$\sigma^H$ , SopOH $\sigma^F$ , SopIIAC $\sigma^E$ , SopIIAC $\sigma^G$ , SopIIAC $\sigma^K$ , SopIIAC	AGGAWWT WGGATA GKCATATT TGAATA AC	12-14 14-15 13-15 17-18 16-17	RGAAT GGnRAYAMTW CATACAMT CATACTA CATAnAnTA	PREDICH, NAIR & SMITH, 1992 SAUER et al., 1995; SUN et al., 1991 TATTI et al., 1995; ROELS, et al., 1992 NICHOLSON et al., 1989 ZHENG et al., 1992
Família $\sigma^{54}$		-24	ESPAÇO	-12	
	$\sigma^N$ , RpoN, SigL	TGGCAC	5	TTGCW	MERRICK, 1993

<sup>a</sup>Somente fatores sigma com seqüência consenso de reconhecimento determinadas estão indicados.

<sup>b</sup>N: qualquer base; R: A ou G; W: A ou T; Y: C ou T; M: A ou C; K: G ou T.

Fonte: HELMANN & CHAMBERLI, 1988; WÖSTEN, 1998

### 2.2.1. Promotores -24/-12

Os promotores reconhecidos pela  $\sigma^{54}$ RNAP são os únicos a apresentarem posições conservadas entre os nucleotídeos -24 e -12 a montante do sítio de início de transcrição (Tabela 2) (BARRIOS, VALDERRAMA & MORETT, 1999).

Barrios, Valderrama e Morett (1999) compilaram e analisaram 186 seqüências promotoras  $\sigma^{54}$ -dependentes; 85 destas foram determinadas experimentalmente e as outras apenas por análise de seqüência. Esta análise mostrou alto grau de conservação nas regiões em volta das posições -24 e -12, como anteriormente reportado por Thöny e Hennecke (1989). Em torno da posição -24 (da posição -31 a -20) houveram 8 nucleotídeos altamente conservados e 3 fracamente com baixo grau de conservação. Adjacente a -12 (da posição -15 a -8), são 5 as bases altamente conservadas e 1 fracamente. Assim a seqüência consenso para os promotores -24/-12 seria: mrNrYTGGCACG-N4-TTGCWNNW (R = purina, Y = pirimidina, W = A ou T e M= A ou G). O nucleotídeo G na posição -24 foi o único presente em todas as seqüências analisadas. O nucleotídeo G na posição -25 é 99% conservado, cuja única exceção é promotor do gene 4521 de *Myxococcus xanthus* (KESELER & KAISER, 1995; WU & KAISER, 1997). O nucleotídeo G na posição -13 é 96% conservado, com 3 exceções: os promotores dos gene *oprE* de *P. aeruginosa* (YAMANO, NISHIKAWA & KOMATSU, 1998), *glnH* de *E. coli* (NOHNO & SAITO, 1997) e *pip* de *Neisseria gonorrhoeae* (ALBERTSON & KOOMEY, 1993). Na posição -12, o resíduo C é 96 % conservado, também com 4 exceções: os promotores dos genes *hoxK* de *Alcaligenes eutrophus* (SCHWARTZ, GERISCHER, & FRIEDRICH, 1998), *pspA* de *E. coli* (JOVANOVIC & MODEL, 1997), *nifH* de *R. leguminosarium* variedade *viciae* (ROELVINK et al., 1990) e *glnB* de *Rhodospirillum rubrum* (JOHANSSON & NORDLUND, 1996) (BARRIOS, VALDERRAMA & MORETT, 1999).

Vários estudos têm mostrado as posições que são críticas para o funcionamento do promotor -24/-12 (KHAN, BUCK & DIXON, 1986; BUCK, 1986; BUCK, KHAN & DIXON, 1985; BUCK & CANNON, 1989; KESELER & KAISER, 1995; MERRICK & CHAMBERS, 1992; MARTIN-VERSTRAETE et al., 1992). Todas as mutações no promotor envolvendo as posições altamente conservadas -25/-24 e -13/-12 causam efeito deletério, reduzindo drasticamente a ligação à holoenzima  $\sigma^{54}$ RNAP (BUCK & CANNON, 1992; WANG & GRALLA, 1998) e a transcrição. Mudanças

qualitativamente similares foram observadas para os genes *nifA* de *Azorhizobium caulinodans* (STIGER, SCHNEIDER & BRUJIN, 1993) *flbG* e *flaN* de *Caulobacter crescentus* (MULLIN & NEWTON, 1989; NINFA et al., 1989; MULLIN & NEWTON, 1993) e *nifH* de *K. pneumoniae* (OW et al., 1985). Mutações no promotor do gene *nifH* de *K. pneumoniae* nas posições -26 (troca de T por C) e -16 (troca de C por T) diminuem a expressão em 25% e na posição -15 (troca de C por T) diminuem em 75% (BUCK & CANNON, 1989). A substituição simultânea dos C das nas posições -17, -16 e -15 de por T aumenta a afinidade da holoenzima *in vivo* e *in vitro* (BUCK & CANNON, 1992; STIGER, SCHNEIDER & BRUJIN, 1993; MORETT & BUCK, 1989). Mutações ao redor da região -24 no sentido de aumentar a similaridade ao consenso, por exemplo, troca de G por A na posição -22 no promotor do gene *nifL* de *K. pneumoniae*, aumenta o nível de expressão em duas vezes (KHAN, BUCK & DIXON, 1986).

O início da transcrição em promotores  $\sigma^{70}$ -dependentes geralmente ocorre com uma purina, sendo adenina mais frequentemente utilizada do que a guanina (HAWLEY & McCLURE, 1983). Esta seleção de nucleotídeos é influenciada pela seqüência da região em torno da posição -35 e pela composição de bases entre as posições -2 e -5 (JEONG & KANG, 1994; FREDRICK & HELMANN, 1997). Na análise realizada por Barrios, Valderrama & Morett (1999), 64% dos 85 promotores  $\sigma^{54}$ -dependentes, com sítio de início de transcrição mapeados, tiveram início de transcrição com uma purina. Em promotores  $\sigma^{70}$ -dependentes o espaçamento entre o primeiro nucleotídeo da posição -10 e o início de transcrição é normalmente de seis a sete nucleotídeos, embora exemplos funcionais de 4 a 10 também tenham sido reportados (HAWLEY & McCLURE, 1983). Os primeiros promotores  $\sigma^{54}$ -dependentes bem caracterizados apresentaram início de transcrição precisamente 12 nucleotídeos a jusante do elemento conservado GC, coincidência que resultou na designação promotor tipo -24/-12 (THÖNY & HENNECKE, 1989). No entanto, estudos posteriores demonstraram que a seleção do nucleotídeo inicial apresenta maior flexibilidade e não há uma preferência do uso de uma única posição, mas que o uso dos nucleotídeos 11, 12 e 13 a jusante do GC apresentam freqüências equivalentes (24, 20 e 27% respectivamente (BARRIOS, VALDERRAMA & MORETT, 1999).

Também já foram reportados alguns casos de início de transcrição três nucleotídeos antes ou depois das posições 11-13. A distância mais curta reportada foi de

oito nucleotídeos para o gene *nifH* de *Parasponia rhizobium* (WEINMAN et al., 1984), *cheAY* de *Rhodospirillum centenum* (JIANG & BAUER, 1997), *nifJ* de *R. rubrum* (LINDBLAD et al., 1996). Estes resultados indicam que apenas as informações de sequenciamento não permitem prever com confiança o início de transcrição (BARRIOS, VALDERRAMA & MORETT, 1999). Em promotores  $\sigma^{70}$ -dependentes o espaçamento ideal entre a posição -35 e -10 é  $17 \pm 1$  nucleotídeos, contudo existem promotores funcionais com espaçamento de 15 a 20 nucleotídeos não conservados (HAWLEY & McCLURE, 1983; DeHASETH & HELMANN, 1995). Em contraste, deleções de um ou mais nucleotídeos na extensão entre as posições -24/-12 eliminam a funcionalidade do promotor -24/-12 (BUCK, 1986; MULLIN & NEWTON, 1989; NINFA et al., 1989; MULLIN & NEWTON, 1993; KESELER & KAISER, 1995). Desta forma, parece ser estritamente necessário que estes motivos estejam posicionados na mesma face das hélices do DNA para ligação da  $\sigma^{54}$ RNAP (BARRIOS, VALDERRAMA & MORETT, 1999).

#### 2.2.2. Estrutura e função da proteína RpoN

As propriedades únicas do fator  $\sigma^{54}$  também são refletidas em sua estrutura. Esta proteína é o único fator sigma que não tem similaridade de seqüência com outros fatores sigma de procariontes, indicando que o fator  $\sigma^{54}$  tem origem diferente do resto dos outros fatores sigma (LONETTO, GRIBSKOV & GROSS, 1992). O número de resíduos de aminoácidos que compõem a RpoN em diferentes organismos varia entre 426 e 526, que se distribuem em três diferentes regiões denominadas I, II e III (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIN, 1987; FISCHER, 1994). A região I está localizada na região N-terminal compreendendo os resíduos aminoácidos 25 a 50, é conservada, rica em resíduos de leucina e glutamina e é responsável pela inibição da isomerização e iniciação da polimerase na ausência de ativação (WANG et al., 1995; SYED & GRALLA, 1998; CANNON et al., 1999), além de estimular a iniciação em resposta ao ativador (SASSE-DWIGHT & GRALLA, 1990; SYED & GRALLA, 1998). Esta região é seguida por uma região pouco conservada, a II, que usualmente está contida entre os aminoácidos 60 e 110. Esta região contém uma alta proporção de resíduos de aminoácidos ácidos e tem sido implicada mudança conformacional que leva a abertura da fita de DNA no complexo transcricional fechado em muitas bactérias e assistência da

ligação de  $\sigma^{54}$  ao DNA hetero ou homoduplex (mas não em todas) (WONG & GRALLA, 1992; CANNON, CHANEY & BUCK, 1999; SOUTHERN & MERRICK, 2000). Foi demonstrado que esta região é essencial para a ligação à RNA polimerase em *E. coli* (TINTUT et al., 1994), porém em algumas espécies se encontra quase que completamente ausente como em *Rhodobacter capsulatus* (BUCK et al., 2000). A região III (carboxi-terminal) é constituído de aproximadamente 400 resíduos de aminoácidos, contém uma região de união denominada X e é bem conservada. Foi demonstrado que a região X faz ligação cruzada com o DNA e apresenta dois importantes motivos na sua porção distal: hélice-volta-hélice (HVH) e a sequência “RpoN Box”, que estão envolvidos no reconhecimento da região promotora dos promotores  $\sigma^{54}$ -dependentes (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIN, 1987; MERRICK & CHAMBERS, 1992; CANNON et al., 1994; WONG, TINTUT & GRALLA, 1994; TAYLOR et al., 1996; BURROWS et al., 2003). A sequência “RpoN box” é caracterizado por 10 resíduos de aminoácidos (ARRTVAKYRE) altamente conservados nas proteínas RpoN (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIN, 1987; WÖSTEN, 1998). Guo e Gralla (1997), através de ensaios de retardamento em gel, demonstraram que mutações pontuais próximas aos aminoácidos 363 e 383 eliminam a capacidade de RpoN de *E. coli* de ligar ao DNA.

Interessantemente, diversos dos motivos estruturais de fator sigma 54 são encontrados em fatores transcricionais de eucariotos, como o zíper de leucina, região acídica e região rica em glutamina (SASSE-DWIGHT & GRALLA, 1990). Estes resultados demonstram a complexa organização funcional de  $\sigma^{54}$  e uma clara distinção da  $\sigma^{70}$  (Figura 2) (MERRICK, 1993; BUCK et al., 2000).

Análises de proteínas RpoN contendo deleções e mutações pontuais têm permitido caracterizar funções específicas de diferentes regiões da proteína, como reconhecimento da região que liga a posição -12 GC do promotor, local de origem da fusão do DNA e envolvimento das sequências das regiões I e II (MERRICK & CHAMBERS, 1992; CHANEY & BUCK, 1999; WANG & GRALLA, 2001; WIGNESHWERARAJ et al., 2001).

Quando  $\sigma^{54}$ RNAP participa de um complexo fechado inativo, um par de base adjacente ao nucleotídeo -12 sofre fusão temporária, formando uma junção em forquilha de DNA fita dupla/fita simples (MORRIS et al., 1994). A conformação da  $\sigma^{54}$  nesta estrutura auxilia a manutenção da RNAP inativa pelo bloqueio de sua capacidade de

separar a fita de DNA. Os ativadores de transcrição podem sobrepujar o silenciamento da RNAP pela  $\sigma^{54}$  através de indução de mudanças conformacionais na holoenzima (CANNON, GALLEGOS & BUCK, 2000; GRALLA, 2000; GUO, LEW & GRALLA, 2000).

Figura 2. Representação estrutural e funcional dos fatores sigma das famílias  $\sigma^{70}$  e  $\sigma^{54}$

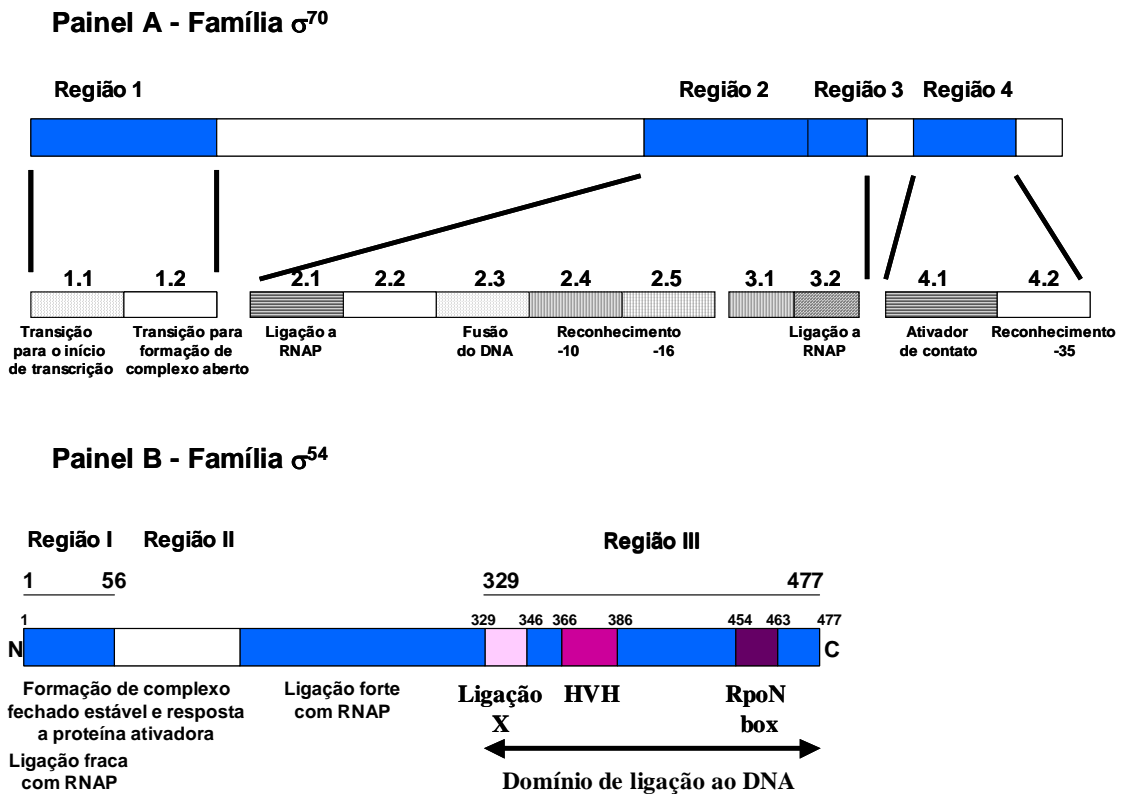


Fig. 2. Estrutura esquemática dos fatores sigma das famílias  $\sigma^{70}$  e  $\sigma^{54}$ . Painel **A**: Organização dos domínios da proteína  $\sigma^{70}$ . As regiões mostradas em caixas azuis representam as regiões mais conservadas dos fatores sigma. Um detalhamento funcional para as sub-regiões das proteínas da família  $\sigma^{70}$  é mostrado em uma visão expandida. Painel **B**: Organização dos domínios da proteína  $\sigma^{54}$ . Os domínios e resíduos envolvidos na interação com a RNAP, proteína ativadora e DNA estão indicados. Na região III, as caixas representam resíduos potencialmente envolvidos na interação com o DNA: ligação cruzada ao DNA (■) (CANNON et al., 1994), motivo hélice-volta-hélice (■) (LONETTO, GRIBSKOV & GROSS, 1992; WIGNESHWERARAJ, ISHIHAMA & BUCK, 2001) e o motivo “RpoN Box” (■) (TAYLOR et al., 1996; WANG & GRALLA, 2001).

Fonte: modificado de WÖSTEN, 1998; BURROWS et al., 2003.



A transição entre o estado inativo e ativo conta com uma complexa rede de interações que envolvem o nucleotídeo na posição -12 (GUO, WANG & GRALLA, 1999; WANG, SYED & GRALLA, 1997; WANG & GRALLA, 1998; WANG, GUO & GRALLA, 1999). As interações com o nucleotídeo -24 são simples, porém determinantes para o direcionamento de ligação ao DNA (SASSE-DWIGHT & GRALLA, 1990; HSIEH & GRALLA, 1994; WONG, TINTUT & GRALLA, 1994).

Um pequeno trecho de resíduos de leucina presentes entre os resíduos 25-31 da região I da subunidade  $\sigma^{54}$  está envolvido na capacidade formar um complexo fechado estável e de responder a proteína ativadora (WANG et al., 1995; WANG & GRALLA, 1996; WANG, SYED & GRALLA, 1997; WANG et al., 1997; SYED & GRALLA, 1998; CANONN et al., 1999; CASAZ, GALLEGOS & BUCK, 1999; GALLEGOS & BUCK, 1999; KELLY & HOOVER, 1999). Mutações nestas regiões além de permitirem o início de transcrição na ausência de proteína ativadora, causam o aparecimento da capacidade de interagir com DNA de fita dupla na região a jusante do promotor (GUO, WANG & GRALLA, 1999).

A região III (R336) da RpoN também tem papel importante na estabilização do complexo fechado e na capacidade de responder a proteína ativadora, uma vez que a deleção do resíduo R336 resulta na ativação da transcrição na ausência do ativador (CHANEY & BUCK, 1999). Por outro lado, mutações na região III podem resultar na eliminação da capacidade de se ligar ao DNA (HSIEH & GRALLA, 1994; SASSE-DWIGHT & GRALLA, 1990). Presume-se que esta região ligue-se também ao elemento -24, uma vez que é a região dominante de ligação do DNA.

Assim, tanto a região N- quanto C-terminal da subunidade  $\sigma^{54}$  participam do reconhecimento do elemento -12 (MERRICK & CHAMBERS, 1992; HSIEH & GRALLA, 1994).

Em um estudo mais recente realizado por Burrows e colaboradores (2003), foram mapeadas as interações estabelecidas pela holoenzima  $\sigma^{54}$ RNAP com a região promotora consenso -24/-12. Foi demonstrado que o motivo “RpoN Box” localiza-se próximo a região promotora -24 no complexo binário  $\sigma^{54}$ RNAP/promotor e que esta localização independe da presença da RNAP. A região I se posiciona próximo da região -12 do promotor, o que é consistente com resultados anteriores (WANG & GRALLA, 2001) e que apóia a função regulatória proposta previamente (CANNON et al., 1999;

WANG, GUO & GRALLA, 1999; GUO, LEW & GRALLA, 2000; CHANEY et al., 2001).

### 2.2.3. Ativação da transcrição dos genes $\sigma^{54}$ -dependentes

Em contraste com a RNA polimerase contendo o fator  $\sigma^{70}$ , a holoenzima contendo  $\sigma^{54}$  é incapaz de iniciar a transcrição por si só, requerendo a presença de um ativador transcricional que catalise a isomerização do complexo fechado para complexo aberto (POPHAM et al., 1989; FISCHER, 1994). Conseqüentemente, a expressão de genes  $\sigma^{54}$ -dependentes está sempre sujeita a um controle positivo por uma proteína ativadora, cuja atividade é modulada em resposta a sinais fisiológicos específicos (KUSTU et al., 1989). Como consequência, a transcrição pode ser completamente desligada (REITZE & SCHNEIDER, 2001). As proteínas NifA e NtrC são reguladores transcricionais relevantes para a expressão dos genes  $\sigma^{54}$ -dependentes envolvidos no processo de fixação de nitrogênio (FISCHER, 1994), e ligam-se à uma seqüência específica de nucleotídeos da região promotora, localizada a cerca de 100 pares de base a montante do promotor consenso -24/-12. Esta região é denominada seqüência ativadora a montante (“upstream activator sequence” ou UAS) (MERRICK, 1992). Os ativadores interagem com a RNA polimerase associada a  $\sigma^{54}$  quando ligados a seus UAS, e esta interação, às vezes, requer uma proteína dobradora de DNA, usualmente IHF em *E. coli* (HOOVER et al., 1990). Quando as proteínas dobradoras de DNA não são necessárias para o início da transcrição, a interação é facilitada pela curvatura intrínseca do DNA (CARMONA, CLAVERIE-MARTIN & MAGASANIK, 1997).

Uma outra característica dos ativadores  $\sigma^{54}$ -dependentes é a necessidade de uma atividade ATPásica, sendo que a modulação desta atividade constitui o controle mais importante dos genes  $\sigma^{54}$ -dependentes (Figura 3) (SHINGLER, 1996).

Com base em dados da literatura e ensaios de clivagem de DNA foi possível propor um modelo preliminar das interações entre o fator  $\sigma^{54}$ , RNAP e a região promotora e das alterações conformacionais do complexo durante o processo de início de transcrição (BURROWS et al., 2003). Foi proposto que a holoenzima  $\sigma^{54}$ RNAP assume uma orientação C- para N-terminal dentro do complexo fechado em relação a dupla fita de DNA 3' – 5', com o motivo “RpoN Box” posicionado sobre a região -24 na direção C- para N-terminal. Durante a formação do complexo fechado, a região I da



$\sigma^{54}$  e o promotor sofrem mudanças conformacionais induzidas pela RNAP através do domínio saliente da subunidade  $\beta$ , criando uma junção em forquilha na posição -12 e forte ligação da região III da  $\sigma^{54}$  ao DNA nesta posição (WIGNESHWERARAJ et al., 2003). Durante a formação do complexo aberto, proteínas ativadoras movem o fator sigma 54 da sua posição, utilizando energia derivada da hidrólise de NTP, para alterar a interação da região I com a região promotora -12. Finalmente, neste trabalho foi verificado que, no promotor em estudo (*nifH* de *S. meliloti*),  $\sigma^{54}$  é liberado do complexo após a formação de oligorribonucleotídeo (cadeia nascente de RNA) com 3 unidades. Este resultado contrasta com a detecção da permanência de  $\sigma^{54}$  ligada ao promotor do gene *glnAp2* de *E. coli* (TINTUT, WANG & GRALLA, 1995) após o escape da RNAP, mas está em concordância com Bondarenko e colaboradores (2002) que relataram a liberação de  $\sigma^{54}$  do promotor.

#### 2.2.4. Proteínas ativadoras de genes $\sigma^{54}$ -dependentes

As proteínas envolvidas na ativação dos promotores  $\sigma^{54}$ -dependentes são denominadas *enhancer-binding proteins* (EBPs) (WEDEL & KUSTU, 1995; ROMBEL et al., 1998; BUCK et al., 2000; ZHANG et al., 2002) e constituem a única classe de ativadores transcricionais de procariotos capazes de se ligar a holoenzima  $\sigma^{54}$ -RNAP (DIXON & KAHN, 2004).

As EBPs possuem uma arquitetura característica presente em todos os membros da família, no qual há um domínio catalítico central com um ou mais domínios regulatórios na região N-terminal e o domínio de ligação ao DNA na região C-terminal (Figura 3) (DIXON & KAHN, 2004).

Estas proteínas ligam a seqüências ativadoras a montante do promotor via seus domínios de ligação ao DNA C-terminal, e na forma de oligômeros altamente ordenados, usam hidrólise de ATP para ativar a transcrição (REITZER & MAGASANIK, 1986; POPHAM et al., 1989; PORTER et al., 1993; SCHOLL & NIXON, 1996; CANNON, GALLEGOS & BUCK, 2000). Estas seqüências ativadoras usualmente estão presentes em 2 ou mais cópias a aproximadamente 70-150 pb a montante da região promotora, contudo em alguns casos podem estar presentes a distâncias de até 1 Kb, ou ainda localizadas a jusante da região promotora (REITZER & MAGASANIK, 1986; GUBLER, 1989; MERRICK, 1993; BELITSKY &

SONENSHEIN, 1999). Para o reconhecimento do UAS, o domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice. O domínio central, altamente conservado, catalisa a formação do complexo aberto pela holoenzima  $\sigma^{54}$ RNAP. Este domínio, também conhecido como modulador de interação  $\sigma^{54}$ , é responsável pela atividade de ATPase e ativação de transcrição (MORETT & SEGOVIA, 1993; STUDHOLME & DIXON, 2003; XU & HOOVER, 2001). Este domínio, pertencente a uma grande família de proteínas AAA<sup>+</sup> (ATPases associada a várias atividades celulares), funciona como uma máquina molecular que remodela seu substrato (NEUWALD et al., 1999; OGURA & WILKINSON, 2001; LUPAS & MARTIN, 2002; DIXON & KAHN, 2004).

Membros da família AAA<sup>+</sup> normalmente funcionam na forma oligomérica, freqüentemente formando estruturas na forma de anéis hexaméricos, cujas mudanças conformacionais são promovidas por interações nucleotídeo dependente (VALE, 2000; ZHANG et al., 2002).

A alteração do estado de oligomerização das EBPs pela ligação ao nucleotídeo trifosfato influencia a interação RNA polimerase-promotor. No domínio AAA<sup>+</sup> encontra-se o motivo de aminoácidos GAFTGA, específico das EBPs, que é crucial para transdução da energia da hidrólise do ATP para isomerização do complexo fechado a complexo aberto e início de transcrição, aparentemente através da interação com o domínio N-terminal da  $\sigma^{54}$  (WANG et al., 1997b; GONZALEZ et al., 1998; ROMBEL et al., 1998; CHANEY et al., 2001; BORDES et al., 2003).

A hidrólise de ATP pela proteína ativadora promove um remodelamento do complexo fechado através de uma série interações proteína-proteína e proteína-DNA, que favorece a formação do complexo aberto (BUCK et al., 2000). Contudo, ainda não está claro como as proteínas ativadoras de transcrição podem provocar as mudanças de conformação do complexo levando a fusão do DNA na região a jusante do promotor (PAGET & HELMANN, 2003).

Vários ativadores de promotores dependentes de  $\sigma^{54}$  têm sido caracterizados em diferentes espécies bacterianas (SHINGLER, 1996; KUSTU et al., 1989). Entre estas, NtrC e NifA que participam da regulação do metabolismo de nitrogênio; DctD do transporte de dicarboxilatos e PspF de resposta ao estresse de *E. coli* constituem o grupo de EBPs melhor estudado (ROMBEL et al., 1998; BUCK et al., 2000; XU & HOOVER, 2001; ZHANG et al., 2002; LEE et al., 2003). Uma lista parcial de EBPs de bactérias e as funções biológicas que eles regulam é fornecida na tabela 3.

Tabela 3. Algumas EBPs  $\sigma^{54}$ -dependentes e suas funções biológicas

EBPs	Organismos	Genes alvo	Funções dos genes alvo
NtrC	Enterobactérias, <i>Rhizobia</i>	<i>glnA</i>	Assimilação de nitrogênio
DctD	<i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>R. leguminosarum</i>	<i>dctA</i>	Transporte de C <sub>4</sub> -dicarboxilatos
FlbD	<i>Caulobacter crescentus</i>	Nível III e IV dos genes <i>fla</i>	Proteínas de filamento e gancho flagelar
RocR	<i>Bacillus subtilis</i>	Operons <i>rocABC</i> e <i>rocDEF</i>	Transporte e utilização de arginina/ornitina
NifA	<i>K. pneumoniae</i> , <i>Rhizobia</i> , <i>A. vinelandii</i> , <i>R. capsulatus</i>	Genes <i>nif</i>	Fixação de nitrogênio
XylR	<i>P. putida</i>	Operon upper <i>xylS</i>	Catabolismo de tolueno e xileno
DmpR	<i>Pseudomonas sp.</i> CF600	Operon <i>dmp</i>	Catabolismo de fenol e metil-fenol
PspF	<i>E. coli</i>	Operon <i>psp</i>	Estabiliza as células sob estresse
HrpS	<i>P.syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Genes relacionados a <i>hrp</i>	Determinantes de virulência

Fonte: XU & HOOVER, 2001

Em Proteobacteria, os genes *nif* são  $\sigma^{54}$ -dependentes e estão invariavelmente sujeitos a ativação transcricional por NifA. A região N-terminal das proteínas NifA contém um domínio GAF, um módulo sinalizador ubíquo que é encontrado em todos os reinos; em alguns casos foi mostrado que este domínio é capaz de ligar pequenas moléculas (nucleotídeos cíclicos e formiato) (HO, BURDEN & HURLEY, 2000). Embora tenha sido demonstrado que domínios GAF de diferentes proteínas NifA tem um papel regulatório da atividade de NifA, em muitos casos o mecanismo preciso da regulação não está claro. Estes domínios parecem ter diversas funções em vários diazotrofos, por exemplo, o domínio GAF de NifA de *A. vinelandii* liga-se a  $\alpha$ -

cetogluturato para modular a atividade do domínio AAA+ em resposta a uma segunda proteína regulatória, NifL. Contudo, o mesmo fenômeno não foi observado em *K. pneumoniae* (LITTLE & DIXON, 2003). Em contraste, domínios GAF de NifA de *A. brasilense* e *H. seropedicae* parecem controlar a atividade de NifA em resposta a concentração de nitrogênio fixado e poderiam interagir com a proteína transdutora de sinal, GlnB (ARSENE, KAMINSKI & ELMERICH, 1996; ARSENE, KAMINSKI & ELMERICH, 1999; SOUZA et al., 1999; BENELLI et al., 2002).

#### 2.2.5. Proteína IHF

O fator de integração do hospedeiro (IHF) de *E. coli* é uma proteína heterodimérica (MILLER et al., 1979), consistindo de duas subunidades, HimA (MM = 11350 Da) (MILLER, 1984; MECHULAM, FAYAT & BLANQUET, 1985) e HimD (MM = 10650 Da) (FLAMM & WEISBERG, 1985), que possuem 25% dos seus resíduos de aminoácidos idênticos (GOOSEN & van de PUTTE, 1995).

A proteína IHF pertence a uma classe de proteínas estruturalmente relacionadas a histonas (DRLICA & ROUVIERE-YANIV, 1987) e é capaz de ligar ao DNA, promovendo uma dobra maior que 160° e envolvendo o DNA em estruturas mais ordenadas (FRIEDMAN, 1988; RICE et al., 1996).

A sequência consenso de ligação de IHF foi derivada de ensaios de proteção do DNA pela IHF contra digestão com DNase I (CRAIG & NASH, 1984). Foi demonstrado que uma molécula de IHF protegia 40 pb, sendo que 13 pb assimetricamente localizados constituía a sequência consenso WATCAANNNTTR (CRAIG & NASH, 1984; GOODRICH, SCHWARTZ & McCLURE, 1990). A região que está em volta desta sequência consenso também tem papel importante para a formação de complexo estável IHF-DNA (van RIJN, van de PUTTE & GOOSEN, 1991). Uma vez que IHF promove uma dobra no DNA, dobra intrínseca ou flexibilidade do DNA constituem determinantes importantes na afinidade de IHF por seus sítios específicos (GOOSEN & van de PUTTE, 1995). Uma região rica em A e T que é frequentemente, mas não sempre, encontrada na região 5' da sequência consenso, tem papel na estabilização da ligação de IHF (HALES, GUMPORT & GARDNER, 1994). Dentro desta região rica em T e A, três A localizados a 9 pb a montante da sequência consenso possuem particular importância para a ligação de IHF na região regulatória do

fago Um. A substituição de 2 A por C resultou na redução da estabilidade do complexo IHF-DNA em 10 vezes (van RIJN, van de PUTTE & GOOSEN, 1991).

IHF participa de uma variedade de processos celulares, incluindo transposição, recombinação sítio específica, iniciação da replicação do DNA, empacotamento de fago bem como controle transcricional de certos genes (FRIEDMAN, 1988). IHF foi inicialmente demonstrado ser requerido para recombinação sítio específico de fago  $\lambda$  com o cromosoma. A sua função neste processo é ordenar o DNA e a proteína integrase dentro de um ordenado complexo núcleo-protéico. Esta função provavelmente é puramente arquitetônica, isto é, dobrar o DNA e assim uma dobra intrínseca do DNA poderia substituir IHF (GOODMAN, NICHOLSON & NASH, 1992).

Imaginava-se que similar mecanismo aplicava-se no papel exercido por IHF como estimulador transcricional de alguns genes  $\sigma^{54}$ -dependentes. Em vários casos, o sítio de ligação de IHF encontra-se entre o sítio de ligação da proteína ativadora e o promotor (Figura 3). A ligação de IHF não afeta nem a formação do complexo fechado e nem a ligação da proteína ativadora. Simplesmente aproxima a proteína ativadora e a  $\sigma^{54}$ RNAP (HOOVER et al., 1990; CLAVERIE-MARTIN & MAGASANIK, 1991). Este papel estrutural de IHF foi confirmado pela substituição funcional de IHF por uma curvatura intrínseca de DNA (MOLINA-LOPEZ, GOVANTES & SANTERO, 1994; PEREZ-MARTIN, TIMMIS & de LORENZO, 1994).

Adicionalmente ao papel arquitetural de IHF nos promotores  $\sigma^{54}$ RNAP, tem sido proposto que IHF exerça outras influências que contribuem com a especificidade e magnitude da transcrição através da topologia do DNA mediada por IHF (SZE, LAURIE & SHINGLER, 2001). Entre estas estão incluídas: a) restrição da ativação transcricional especificamente por ligação de um regulador a seqüência a montante (CLAVERIE-MARTIN & MAGASANIK, 1992; DWORKIN, JAVANOVIC & MODEL, 1997; DWORKIN, NINFA & MODEL, 1998; PÉREZ-MARTÍN & LORENZO, 1995) ou via transdução de sinal (WASSEM et al, 2000); b) auxílio da ligação do regulador (JOVANOVIC & MODEL, 1997); c) recrutamento  $\sigma^{54}$ RNAP (BERTONI et al., 1998) e d) estímulo da transcrição e formação do complexo núcleo-protéico (SZE, LAURIE & SHINGLER, 2001).



### 2.2.6. Vias metabólicas dependentes de $\sigma^{54}$

Atualmente, uma grande variedade de genes  $\sigma^{54}$ -dependentes de bactérias Gram positivas e negativas são conhecidos. Estes genes apresentam a característica em comum de não serem essenciais para o crescimento (MERRICK, 1993). Porém, há uma exceção, em  $\square$   $\square$   $\hat{e}$

REITZER, 2003). O sistema é composto de um sistema regulatório de dois componentes NtrB-NtrC, o qual promove um controle da expressão de vários genes RpoN-dependentes em resposta a disponibilidade de nitrogênio. Em muitas bactérias, os genes normalmente reconhecidos pelos reguladores transcricionais *NtrBNtrC* incluem: *glnAntrBC* (GARCIA et al., 1977; GAILLARDIN & MAGASANIK, 1978; LEONARDO & GOLDBERG, 1980; MAGASANIK, 1982; HIRSCHMAN et al., 1985; HUNT & MAGASANIK, 1985; CLAVERIE-MARTIN & MAGASANIK, 1991); genes que codificam sistemas de transporte para arginina (*argG*) (SCHMITZ et al., 1987), histidina (*hisJQMP*) (SCHMITZ et al., 1987); genes requeridos para assimilação de nitrato e nitrito (*nasFEDCBA*) (PEDROSA & YATES, 1984; SANTERO et al., 1986; TOUKDARIAN & KENNEDY, 1986; SZETO et al., 1987; CALI, MICCA & STEWART; 1989; RONSON et al., 1987a; ROMERMANN et al., 1989); genes envolvidos na regulação da fixação de nitrogênio (*nifA*) (PEDROSA & YATES, 1984; HASELKORN, 1986; AUSTIN, HENDERSON & DIXON, 1987; WONG et al., 1987). A disponibilidade de nitrogênio no meio é comunicada ao sistema NtrB-NtrC através das proteínas transdutoras de sinal da família PII, a qual está sujeita a modificação covalente pela enzima uridililtransferase/uridilil removedora (UTase/UR) (codificada pelo gene *glnD*) em resposta a disponibilidade de glutamina. Muitas proteobactérias contêm pelo menos duas PII homólogas, frequentemente GlnB e GlnK, as quais são codificadas pelos genes *glnB* e *glnK* respectivamente. A disponibilidade de mais do que uma homóloga de PII habilita as cascatas hierárquicas, por exemplo, uma ou mais PII alvos podem controlar a expressão de uma segunda proteína transdutora de sinal, a qual por sua vez pode interagir com diferentes alvos (MERRICK & EDWARDS, 1995; DIXON & KAHN, 2004).

#### 2.2.6.1.1. Assimilação de nitrato

Nitrato constitui uma fonte importante de nitrogênio para as bactérias. Recentes estudos têm revelado os genes estruturais e regulatórios responsáveis pelo fenótipo de assimilação de nitrato. Os gêneros melhor estudados são as cianobactérias (*Synechococcus* e *Anabaena*),  $\gamma$ -Proteobacteria (*Klebsiella* e *Azotobacter*) e bactérias gram positivas (*Bacillus*). Os genes requeridos para assimilação de nitrato em *K. oxytoca* são *nasFEDCBA*. A nitrato redutase é constituída de duas subunidades, a catalítica (NasA) e a subunidade (NasC) que está ligada ao cofator FAD o qual media a

transferência de elétrons do NADPH para NasA. O gene *nasB* codifica para a nitrito redutase e o operon *nasFED* codifica para um sistema de transporte nitrito e nitrato ATP dependente (LIN & STEWART, 1998; WU & STEWART, 1998; RICHARDSON et al., 2001). A regulação deste grupo de genes está sujeito ao controle por amônia e nitrato/nitrito. O primeiro está sob controle do sistema *ntr* (WU et al., 1999) e o segundo da proteína anti-terminadora de transcrição (NasR), a qual liga-se diretamente ao RNA mensageiro *nasF* (WU et al., 1999; LIN & STEWART, 1996).

Baldani e colaboradores (1986) demonstraram que *H. seropedicae* assimila nitrato, uma vez que é capaz de crescer em nitrato como fonte única de nitrogênio.

#### 2.2.6.1.2. Glutamina sintetase

A amônia, proveniente do ambiente ou formada a partir do nitrato ou dinitrogênio, é assimilada primariamente pela sua incorporação em aminoácidos. A enzima requerida para assimilação de íons amônio em condições limitantes de nitrogênio é a glutamina sintetase (GS) (MAGASANIK, 1982; MERRICK & EDWARDS, 1995; REITZER, 2003). Esta enzima catalisa a única reação de formação de glutamina, e sua perda resulta em crescimento auxotrófico para glutamina (REITZER, 2003). O gene *glnA* (gene que codifica para GS) de *E. coli* é expresso a partir de dois promotores, *glnAp1* e *glnAp2*, enquanto que a jusante os genes *ntrBC* estão expressos pelo promotor *glnAp1* ou um separado promotor (*pnrtBC*), situado entre *glnA* e *ntrBC* (UENO-NISHIO, BACKMAN, & MAGASANIK, 1983; DIXON, 1984; MacFARLANE & MERRICK, 1985; REITZER & MAGASANIK, 1985). Em condições de suficiente disponibilidade de íons amônio, *glnA* é expresso a partir de *glnAp1* pela  $\sigma^{70}$  RNAP, mas a maioria dos transcritos terminam logo a jusante a *glnA* e a expressão de *ntrBC* ocorre primariamente a partir de *pnrtBC*. Em condições limitantes de nitrogênio, NtrC liga aos seus UAS que sobrepõe *glnAp1* reprimindo-o e ativando *glnAp2* pela  $\sigma^{54}$  RNAP. Esta transcrição ocorre em níveis elevados e permite leitura através de *ntrBC*. Esta organização permite baixos níveis de *glnA ntrBC* em altos de íons amônio e marcada elevação em limitação de nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Tabela 4. Exemplos de genes  $\sigma^{54}$ -dependentes

Produto do gene	Gene/operon	Organismo	Ativador	UAS	$\sigma^{54}$ -dependente	Referências <sup>1</sup>
Nitrato e nitrito redutases assimilatórias	<i>nasFEDCAB nas</i>	<i>K. oxytoca</i>	NtrC		+	1
		<i>K. pneumoniae</i>	NtrC		+ <sup>d</sup>	2
		<i>A. vinelandii</i>	NtrC		+ <sup>c, f</sup>	3, 4
		<i>R. meliloti</i>	NtrC		+ <sup>c, f</sup>	5, 6
		<i>A. brasilense</i>	NtrC		+ <sup>f</sup>	7
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Desconhecido		+ <sup>c</sup>	8
Glutamina sintetase	<i>glnA</i>	<i>E. coli</i> ; <i>S. typhimurium</i> ;	NtrC	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, c, e, f</sup>	9, 10, 11, 12,13,14
		<i>K. pneumoniae</i>	Desconhecido		+ <sup>c</sup>	15
		<i>P. aeruginosa</i>	NtrC	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, f</sup>	16
Dinitrogenase ( <i>nifDK</i> ) e dinitrogenase redutase ( <i>nifH</i> )	<i>nifHDK</i>	<i>k. pneumoniae</i>	NifA	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, c, d</sup>	13, 17
		<i>A. vinelandii</i>	NifA		+ <sup>a, c, f</sup>	18, 3, 19, 4
		<i>A. brasilense</i>	NifA		+ <sup>+</sup>	7
		<i>R. capsulatus</i>	NifA	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, c, f</sup>	20, 21, 22
		<i>R. meliloti</i>	NifA	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, c, f</sup>	5
		<i>B. japonicum</i>	NifA	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, b, d, f</sup>	23
Ativador transcricional dos genes <i>nif</i>	<i>nifA</i>	<i>K. pneumoniae</i>	NtrC	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a</sup>	25, 17
		<i>R. capsulatus</i>	NtrC <sup>H</sup>		+ <sup>a</sup>	26
		<i>B. japonicum</i>	Desconhecido	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, b</sup>	27
		<i>H. seropedicae</i>	NtrC	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, d</sup>	28
Transportador de amônio	<i>orf1glnKamtB</i>	<i>H. seropedicae</i>	NtrC	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a</sup>	29
Transporte de aminoácidos Alanina/serina/glicina Arginina/histidina	<i>fkfB – cycA argT/hisJQMP - - sacC</i>	<i>E. coli</i>	Nac		+ <sup>a</sup>	30
		<i>E. coli</i>	- /NtrC	-/+ <sup>g, i</sup>	+ <sup>a</sup> /-	31
		<i>P. putida</i>			+ <sup>a</sup>	32
		<i>P. focilis</i>			+ <sup>a</sup>	32
		<i>B. substilis</i>			+ <sup>c</sup>	33

Glutamato – aspartato	<i>gltIJKL</i>	<i>E. coli</i>	NtrC	+	+ <sup>a, k</sup>	34
Glutamina	<i>glnHPQ</i>	<i>E. coli</i>	NtrC	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, j</sup>	34,35
Transportador de ácidos dicarboxílicos	<i>dctA</i>	<i>Rhizobia</i> <i>Alcaligenes eutrophus</i>	DctD	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, e, f</sup> + <sup>c</sup>	36, 37, 5 8
Síntese de flagelo	<i>flbG, flaN, flaK,</i> <i>flgF, flgK, flgL</i>	<i>Caulobacter crescentus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. brasilense</i>	Desconhecido Desconhecido	+ <sup>g</sup>	+ <sup>a, b, e</sup> + <sup>c</sup> + <sup>c</sup>	38, 39, 40, 41, 42, 43 44 45

<sup>a</sup>Presença de promotor  $\sigma^{54}$  dependente a montante do sítio de início de transcrição para o gene. Os promotores são caracterizados por conservados GC que se localiza a jusante do conservado GG

<sup>b</sup>Análise mutacional do promotor, particularmente por alterações dos dubletes ou espaçamento entre eles

<sup>c</sup>Perda de transcrição em mutantes *rpoN*

<sup>d</sup>Perda de transcrição quando o gene é transferido para estirpes de *E. coli rpoN*

<sup>e</sup>Transcrição *in vitro* pela  $\sigma^{54}$  RNAP

<sup>f</sup>Dependência de ativador transcricional que é conhecido e ativadores de genes  $\sigma^{54}$ -dependentes

<sup>g</sup>Requerimento de sequência que tinha sido demonstrado atividade de sítio de ligação do ativador ou inferido

<sup>h</sup>Não há evidências diretas

<sup>i</sup>Apenas um sítio de ligação para NtrC

<sup>j</sup>O operon possui dois promotores, *glnHp* não foi estudado, na tabela esta se referindo ao *glnHp2*

<sup>k</sup>Antes do operon *gltIJKL* há um gene que codifica para uma transporase e a montante deste gene há um promotor  $\sigma^{54}$ -dependente e dados de microarranjo indicam aumento da transcrição de *gltI* 3 a 6 x, sugerindo que o promotor que precede o gene da transporase possa iniciar a transcrição de *gltIJKL*. Não há promotor potencial -24/-12 precedendo *gltI*

<sup>l</sup>Referências bibliográficas correspondentes aos números são: 1. WU et al, 1999; 2. CALI, MICCA & STEWART, 1989; 3. SANTERO et al, 1986, 4. TOUKDARIN & KENNERY, 1986; 5. RONSON et al, 1987a; 6. SZETO et al, 1987; 7. PEDROSA & YATES, 1984; 8. ROMERMMAN et al, 1989; 9. GAILLARDIN & MAGASANIK, 1978; 10. GARCIA et al, 1977; 11. HIRSCHMAN et al, 1985; 12. HUNT & MAGASANIK, 1985; 13. LEONARDO & GOLDBERG, 1980; 14. MAGASANIK, 1982; 15. ISHIMOTO & LORY, 1989; 16. PERSUHN et al, 2000; 17. WONG et al, 1987; 18. BENNET, CANNON, DEAN, 1988; 19. SANTERO et al, 1988; 20. JONES & HASELKORN, 1988; 21. JONES & HASELKORN, 1989; 22.

MASEPOHL, KLIPP & PUHLER, 1988; 23. FISCHER, ALVAREZ-MORALES & HENNECKE, 1986; 24. MACHADO et al, 1996; 25. AUSTIN, HENDERSON & DIXON, 1987; 26. HASELKORN, 1986; 27. THONY et al 1987; 28. SOUZA et al, 2000; 29. NOINDORF et al, 2006; 30. LESSARD et al, 1998; 31. REITZER & SCHNEIDER, 2001; 32. MERRICK, 1993; 33. DEBARBOVILLE et al, 1991; 34. ZIMMER et al, 2000; 35. CLAVERIE-MARTIN & MAGASANIK, 1991; 36. RONSON, ASTWOOD & DOWNIE, 1984; 37. RONSON et al, 1987b; 38. CHAMPER, DINGWALL & SHAPIRO, 1987; 39. MINNICH & NEWTON, 1987; 40. MULLIN et al, 1987; 41. MULLIN & NEWTON, 1989; 42. NINFA et al, 1989; 43. OHTA et al, 1985; 44. TOTTEN, LARA & LORY, 1990 e 45. MILCAMPS et al., 1996.

Fonte: modificado de MERRICK, 1993 e KUSTU et al, 1999

Em *H. Seropedicae* os genes *glnAntrBC* foram seqüenciados e constituem um único operon onde a transcrição é iniciada a partir de dois promotores, um RpoN-dependente e outro  $\sigma^{70}$ -dependente. Ambos os promotores localizam-se a montante de *glnA* (PERSUHN et al., 2000).

#### 2.2.6.1.3. Fixação biológica de nitrogênio

Os genes *nif* codificam proteínas especificamente envolvidas na fixação de nitrogênio e estes genes estão submetidos a mecanismos regulatórios rígidos. A maioria dos promotores RpoN-dependentes tem sido encontrada em bactérias fixadoras de nitrogênio, contudo em algumas bactérias, nem todos os genes envolvidos da fixação de nitrogênio ou sua regulação apresentam promotores -24/-12, como no caso do gene *nifH* e *glnA* de *Anabaena* (AUSUBEL, 1984; MERRICK, 1992).

A co-dependência da NifA e RpoN para a ativação da expressão dos genes *nif* assegura uma regulação rigorosa (DIXON & KAHN, 2004). NifA é o principal regulador da fixação de nitrogênio e, embora as cascatas de regulação difiram entre os diazotrofos, a regulação final do circuito resulta da modulação da atividade ou expressão de NifA em resposta ao oxigênio e/ou nitrogênio fixado (DIXON & KAHN, 2004).

A expressão de *nifA* está mais comumente sujeita a regulação pelo sistema geral de controle de nitrogênio (*ntr*), contudo outras formas de regulação são conhecidas (MERRICK & EDWARDS, 1995; DIXON & KAHN, 2004).

Em *H. seropedicae*, os genes *nif* foram encontrados em duas regiões, região I contendo os genes *nifA* e *nifB* (SOUZA et al., 1991a) e região II *nifQmodABC* e *fixC* (KLASSEN et al., 1999) seguido do operon *nifHDKENXorf1orf2orf3* (Machado et al., 1996; KLASSEN et al., 1999; PEDROSA et al., 2001) 3Kb a jusante. Recentemente, o sequenciamento genômico de *H. seropedicae* revelou que estas duas regiões de fato constituem um agrupamento único de genes *nif* de aproximadamente 40 Kb ([www.genopar.org](http://www.genopar.org)). A regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* envolve NifA (SOUZA et al., 1991a e b) e o sistema *ntr* (PEDROSA et al., 2001). A expressão do promotor *nifA* é dependente de NtrC e RpoN (WASSEM et al., 2000) e a atividade de NifA é regulada por íons amônio e oxigênio (PEDROSA et al., 2001). O sensoriamento de íons amônio é realizado pelo domínio N-terminal (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999) em conjunto com a proteína PII (GlnB) (BENELLI et al., 2002) e o de níveis de oxigênio provavelmente ocorra através de seu interdomínio (MONTEIRO et al., 1999; SOUZA, et al., 1999).

#### 2.2.6.1.4. Transporte de amônio

A maioria dos microorganismos usa íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) como fonte preferida de nitrogênio. Embora amônia ( $\text{NH}_3$ ) seja membrana-permeável, transportadores dependentes de energia para  $\text{NH}_4^+$  têm sido encontrados em diversas espécies bacterianas (SIEWE et al., 1996; MEIER-WANGNER et al., 2001). Estes transportadores usualmente são inibidos por glutamina e sua expressão é regulada pela disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  (KLEINER, 1985). Em altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , por exemplo, no meio de cultura, quando o fornecimento de nitrogênio via difusão da  $\text{NH}_3$  é suficiente, os sistemas de transporte são reprimidos. Em geral, transporte  $\text{NH}_4^+$  é catalisado por sistemas secundários de transporte que dependem do potencial de membrana como força de propulsão (SIEWE et al., 1996).

Proteínas da família de transporte de amônio (Amt) contêm um único e ubíquo grupo de proteínas integrais de membrana, as quais estão distribuídas em todos os domínios. Estas estão presentes em bactéria, arquea, fungos, plantas, animais e inclusive humanos (SAIER et al., 1999; HOWITT & UDVARDI, 2000; MARINI et al., 2000; THOMAS, MULLINS & MERRICK, 2000). As proteínas Amt são transportadores de amônio de alta afinidade que provavelmente funcionam como captadores de amônio do ambiente e recaptura de amônio perdido pelas células pela difusão através da membrana

(COUTTS et al., 2002). Em *Saccharomyces cerevisiae* e *R. capsulatus*, proteínas Amt tem sido implicadas também no sensoriamento de amônio no meio externo (LORENZ & HEITMAN, 1998; YAKUNIN & HALLENBECK, 2000).

A maioria dos microorganismos pertencentes à Bacteria e Archaea codificam ao menos uma proteína Amt, e com poucas exceções, o gene codificador do transportador (*amtB*) encontra-se no mesmo operon que um segundo gene (*glnK*) que codifica para proteína GlnK (tipo PII) (THOMAS, COUTTS & MERRICK, 2000; ARCONDEGUY, JACK & MERRICK, 2001) como ocorre em *H. seropedicae* (NOINDORF et al., 2006).

#### 2.2.6.1.5. Transporte de aminoácidos

Em *E. coli*, mais da metade dos genes ativados por limitação de nitrogênio codificam para sistemas de transporte. Esta ativação usualmente não requer indução específica. Além disso, a inativação de genes  $\sigma^{54}$ -dependentes de sistema de transporte de aminoácidos não impede o crescimento da bactéria em meios contendo os respectivos aminoácidos (REITZER & SCHNEIDER, 2001). Sugere-se então, que os sistemas de transporte de aminoácidos *rpoN*-dependentes teriam a função de captar aminoácidos em situações de limitação de nitrogênio (ZIMMER et al., 2000; REITZER & SCHNEIDER, 2001). Alguns sistemas de transporte de aminoácidos *rpoN*-dependentes conhecidos estão descritos na tabela 4.

#### 2.2.6.2. Transporte de ácidos dicarboxílicos

Ácidos dicarboxílicos (malato, succinato, piruvato) constituem a fonte preferida de carbono para *H. seropedicae*, especialmente para o crescimento dependente de dinitrogênio (BALDANI et al., 1986). Muitas bactérias podem conter um ou mais carreadores de ácidos dicarboxílicos, os quais podem ser classificados em cinco grupos (Tabela 5): transportador de dicarboxilato (DctA); três famílias que fazem captação de dicarboxilato (DcuAB, DcuC, CitT) e a família de transportadores periplasmáticos ATP-independente (TRAP) (Anexo 3). A maioria destes carreadores transportam ácidos C<sub>4</sub>-dicarboxílicos (malato, succinato, fumarato), aminoácidos C<sub>4</sub>-dicarboxílicos (aspartato) (JANAUSCH et al., 2002)

A família DctA compreende um grande número de carreadores de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas e catalisa a captação de C<sub>4</sub>-dicarboxilatos durante



crescimento aeróbico. A família DctA é membro da família de carreadores dicarboxilato/aminoácido:cátion simporte (DAACS) (PAULSEN, SLIWINSKI & SAIER, 1998; JANAUSCH et al., 2002).

Os carreadores da família DcuAB estão presente apenas em bactérias anaeróbicas e anaeróbicas facultativas capazes de fazer respiração usando fumarato (SIX et al., 1994; ZIENTZ, SIX & UNDEN, 1996; JANAUSCH & UNDEN, 1999; ULLMANN et al, 2000). A família DcuC é funcionalmente similar aos carreadores DcuAB e catalisam a troca e efluxo de C<sub>4</sub>-dicarboxilatos em condições de crescimento anaeróbico (ZIENTZ, SIX & UNDEN, 1996), mas a principal função parece ser efluxo. A família TRAP constitui uma família nova de carreadores secundários compostos de duas proteínas integrais de membrana e uma proteína periplasmática ligadora de soluto (KELLY & THOMAS, 2001). O carreador DctPQM de *R. capsulatus* foi caracterizado (SHAW, HAMBLIN & KELLY, 1991; FORWARD et al., 1997) e tem sido encontrado homólogos a ele em bactérias Gram negativas e Archaea (*Achaeoglobus fulgidus*). Estes carreadores estão separados dos demais carreadores secundários devido a sua estrutura primária, composição de suas subunidades e modelo funcional (JANAUSCH et al., 2002).

A família carboxilato:C<sub>4</sub>-dicarboxilato antiporte constitui um subgrupo da família de carreadores ânion divalente:Na<sup>+</sup> simporte (DASS) (SAIER, 1998) e possui como membro o carreador citrato:succinato antiporte CitT de *E. coli* (KELLY & THOMAS, 2001). Carreadores desta família são encontrados em eucariotos e em um número restrito de bactérias e catalisam principalmente troca de di- e tricarbolicilatos (JANAUSCH et al., 2002).

Adicionalmente a estes carreadores de C<sub>4</sub>-dicarboxilatos, um número considerável de outros carreadores são capazes de transportar C<sub>4</sub>-dicarboxilatos com baixa afinidade. Em estirpes mutantes ou em condições específicas, estes carreadores podem assumir a função de transporte dos carreadores de C<sub>4</sub>-dicarboxilatos. Entre estes se encontram o  $\alpha$ -cetogluturato:H<sup>+</sup> simporte (KgtP de *E. coli*) (SEOL & HATKIN, 1991), um provável carreador de monocarboxilato de *E. coli* (JANAUSCH, KIM & UNDEN, 2001), e transportadores das famílias TDT (telurato:dicarboxilato) e CCS (citrato:cátion simporte) (SAIER, 1998).

Tabela 5. Famílias de transportadores de C<sub>4</sub>-dicarboxilatos

Grupo	Organismo	Transporte	Referencias <sup>a</sup>
1. DAACS: 1.1 DctA	<i>E. coli</i> <i>Rhizobium</i>	Catalisa captação de C <sub>4</sub> -dicarboxilatos aeróbicos. C <sub>4</sub> -dicarboxilatos, aspartato. Transporte de C <sub>4</sub> -dicarboxilatos e fixação de nitrogênio simbiótico.	1 2, 3 4
1.2 Ygj U	<i>E. coli</i>	Carreador relacionado ao DctA.	
2. DcuAB		Carreadores presentes em bactérias anaeróbicas e aeróbicas facultativas capazes de respiração usando fumarato.	5, 6, 7
2.1 DcuA 2.2 DcuB	<i>E. coli</i> ; <i>Wolinella succinogenes</i>	Suporte para DcuB/C e para troca de DctA para DcuB/C. Troca, captação (anaeróbica).	6, 8
3. DcuC		Efluxo, troca, captação (anaeróbica). É encontrado em bactérias que produzem succinato durante a fermentação da glicose. A maioria das bactérias que possuem sistemas de transporte homólogos a DcuC são patogênicas.	9
3.1 DcuC 3.2 DcuD 3.3 DcuE	<i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>H. influenzae</i>	Orf PM 1299	10, 11 12 9
4. TRAP		Carreadores secundários que usam gradiente eletroquímico com força motriz.	9
<i>dctPQM</i>	<i>R. capsulatus</i>	DctM e DctQ são proteínas integrais de membrana e DctP proteína periplasmática receptora de soluto.	13, 14
<i>yiaMNO</i>	<i>E. coli</i>	YioM e homólogo a <i>dctQ</i> , <i>giaN</i> a <i>dctM</i> e <i>yiaO</i> a <i>dctP</i> dispostos em um arranjo diferente.	15
<i>dctP-QM</i> <i>dctPQ-M</i>	<i>Rhizobium</i> <i>H. influenzae</i>	Possui dois componentes DctP e DctQ fundido ( <i>dctPQ</i> ). Os genes que codificam para os componentes de membrana estão fusionados enquanto que o receptor de solução extracitoplasmático e	16 15

		codificado por um gene separado.	
5. CitT		Encontrado em poucas bactérias. Promove troca citrato/succinato(anaeróbico).	9, 15, 17

<sup>a</sup>Referências bibliográficas correspondentes aos números são: 1. KAY & KORNBERG, 1971; 2. FINNAN, WOOD & JORDAN, 1983; 3. RONSON, LYTTLETON & ROBERTSON, 1981; 4. WELCH et al., 2002; 5. UNDEN & BONGAERTS, 1997; 6. SIX et al., 1994; 7. ENGEL, KRAMER & UNDEN, 1992; 8. ULLAMANN et al., 2000; 9. JANAUSCH et al., 2002; 10. ZIENT, SIX & UNDEN, 1996; 11. ZIENT et al., 1999; 12. JANAUSCH & UNDEN, 1999; 13. SHAW, HAMBLIN & KELLY, 1991; 14. FORWARD et al, 1997; 15. KELLY & THOMAS, 2001; 16. FREIBERG et al, 1997 e 17. SAIER, 1998.

### 2.2.6.3. Síntese de flagelos

*H. seropedicae* possui dois flagelos polares e, ocasionalmente pode apresentar um a três em ambos os pólos (BALDANI et al., 1996).

Vários estudos têm sugerido que a transcrição dos genes que codificam para proteínas constituintes de flagelos é mediada pela RNAP contendo fatores sigma alternativos. Em alguns organismos, como *P. aeruginosa* (TOTTEN, LARA & LORY, 1990), *A. brasilense* (MILCAMPES et al., 1996) e *Caulobacter crescentus* (MULLIN et al., 1987), os genes envolvidos na síntese de flagelo são  $\sigma^{54}$ -dependentes. Estirpes mutantes *rpoN* negativas destes organismos não apresentam flagelo e perdem a motilidade.

### 2.2.7. Controle dos níveis e atividade de RpoN

A atividade dos fatores sigma, e conseqüentemente a atividade dos promotores reconhecidos por eles, podem ser controlados em diferentes níveis: síntese de novo (em nível transcricional ou traducional), processamento pós-traducional, degradação proteolítica e inibição pós-traducional (PAGET & HELMANN, 2003). Alguns fatores sigma, como  $\sigma^S$  de *E. coli*, são regulados em quase todos os níveis (HENGGE-ARONIS, 2002).

O sistema de controle mais difundido é a inibição pós-traducional realizada por fatores anti-sigma, proteínas que se ligam aos fatores  $\sigma$  de forma reversível prevenindo sua interação com a RNAP (HUGHES & MATHEE, 1998; HELMANN, 1999). A ativação do fator  $\sigma$  depende de um sinal que modifica a sua interação com o fator anti-sigma cognato (PAGET & HELMANN, 2003).

A expressão de *rpoN* geralmente é constitutiva (CASTANO & BASTARRACHEA, 1984), mas em alguns casos, como em *R. capsulatus* é regulada pelos níveis de amônio e oxigênio (KRANZ & HASELKORN, 1985; WÖSTEN, 1998). Em *C. crescentus* a expressão de *rpoN* é regulada temporariamente durante o ciclo celular (BRUN & SHAPIRO, 1992). Em *B. japonicum* *rpoN1* é regulado em resposta ao oxigênio e *rpoN2* é negativamente auto-regulado (KULLIK et al., 1991). Genes *rpoN* negativamente auto-regulados também foram encontrados em *P. putida* e *Rhizobium etli* (MICHIELS et al., 1998).

Baixos níveis de  $\sigma^{54}$  podem ter implicações regulatórias, pois existe a possibilidade de que diferentes operons compitam por  $\sigma^{54}$ . Esta possibilidade torna-se ainda mais plausível quando existe relação fisiológica entre os produtos dos genes  $\sigma^{54}$ -dependentes (REITZE & SCHNEIDER, 2001). Esta possibilidade tem sido avaliada em *P. putida*, onde foi relatado o baixo número de moléculas de  $\sigma^{54}$  disponíveis na célula. Adicionalmente, já foi demonstrado *in vivo* que  $\sigma^{54}$ -RNAP não é capaz de se ligar ao promotor Pu, a não ser que seja recrutada por IHF (BERTONI et al., 1998; CARMONA, de LORENZO & BERTON, 1999; VALLS, BUCKLE & de LORENZO, 2002). A competição entre fatores sigma pela RNA polimerase na fase estacionária parece ser determinante para a regulação de um outro promotor  $\sigma^{54}$ -dependente (Po) em *P. putida* (JISHAGE et al., 2002; LAURIE, 2003). Desta forma, o baixo nível de  $\sigma^{54}$  decisivamente pode contribuir para a capacidade da célula em adaptar rapidamente o seu metabolismo em resposta a mudanças nas condições ambientais (JURADO, FERNANDEZ & de LORENZO, 2003).

## OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve por objetivo determinar as funções de RpoN em *H. seropedicae*, caracterizar o promotor *nifB* de *H. seropedicae* e analisar a participação de IHF na região promotora do gene *nifB*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar o gene *rpoN* de *H. seropedicae*;
- Clonar o gene *rpoN* em vetores de expressão;
- Obter de mutantes *rpoN* de *H. seropedicae*;
- Caracterização do promotor *nifB* de *H. seropedicae*
- Super-expressar e purificar a proteína RpoN-His de *H. seropedicae*.
- Caracterizar a atividade de ligação da proteína RpoN-His de *H. seropedicae* ao promotor *nifB* de *H. seropedicae* *in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Reagentes

Antibióticos, aminoácidos, albumina bovina, acrilamida, SDS, agarose, lisozima, *o*-nitrofenol- $\beta$ -D-galactosídeo, bis-acrilamida, persulfato de amônio, TEMED, Tris base, ditioneitol, DEAE-cellulose, formaldeído, triton X-100, EDTA e Ficoll foram adquiridos de Sigma Chemical Company. O glicerol e o sulfato de amônio foram obtidos da Merck. DEAE *sepharose fast flow*, padrão de massa molecular de proteínas, Superose 12 HR 10/30, pronase, desoxiribonucleotídeos, enzimas de restrição, T4-DNA ligase, DNA polimerase fragmento Klenow e RNase foram adquiridos de GE HealthCare, Invitrogen, Boheringer Mannheim Biochemica ou da Sigma Chemical Company. Nucleotídeos marcados com [<sup>35</sup>S] ou [<sup>32</sup>P] foram adquiridos da GE HealthCare. O padrão de tamanho molecular 1 Kb ladder foi adquirido da Invitrogen. Os demais reagentes (pró-análise ou ultrapuro) foram provenientes de diversas fontes.

A água utilizada para preparo dos reagentes foi purificada em um aparelho MilliQ (Millipore) que produz água reagente tipo I (*American Society for Testing & Materials* - ASTM). As soluções e tampões termo-estáveis foram autoclavadas a 120° C por 20 minutos.

### 2. Microrganismos e plasmídeos

Os microrganismos e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 6.

### 3. Antibióticos

As concentrações utilizadas de antibióticos para estirpes de *Escherichia coli* foram as seguintes: ampicilina 200  $\mu$ g/mL, canamicina 50  $\mu$ g/mL, cloranfenicol 30  $\mu$ g/mL, estreptomicina 10  $\mu$ g/mL e tetraciclina 10  $\mu$ g/mL. Para *Herbaspirillum seropedicae* foram: estreptomicina 80  $\mu$ g/mL, canamicina 500 $\mu$ g/mL e tetraciclina 10  $\mu$ g/mL. Ampicilina, canamicina e estreptomicina foram dissolvidos em água, esterilizados por filtração (filtro Millipore 0,45 ou 0,2  $\mu$ m) e estocados a -20°C.

Cloranfenicol e tetraciclina foram solubilizados em etanol 95% e as soluções mantidas a -20°C.

Tabela 6. Estirpes e plasmídeos.

Estirpes/Plasmídeos	Fenótipo/Genótipo	Fonte
Estirpes:		
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> :		
- SmR1	Estirpe selvagem, Nif <sup>+</sup> , Sm <sup>R</sup>	KLASSEM et al., 1997
- SmR13.17	Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>rpoN</i>	Esta tese
- DCP286A	Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , <i>ntrC</i> <sup>-</sup>	PERSHUN et al., 2000
<i>Escherichia coli</i> :		
- DH10B	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta lacX74$ <i>endA1 recA1 deoR</i> $\Delta(ara, leu)$ 7697 <i>araD139 galU</i> $\lambda$ - <i>galK nupG rpsL</i>	LOROW, D. & JESSEE, J., 1990.
- 71-18	F <sup>-</sup> [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15] <i>supE thi</i> $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta glnF2518$ ( <i>rpoN</i> ) e <i>AhsdR supE44</i> $\Delta lac4169$ BI <sup>-</sup> Str <sup>R</sup> , <i>sup</i> <sup>0</sup> , <i>galK</i> <sup>-</sup> , F <sup>-</sup>	SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989.
- TH1	Str <sup>R</sup> , <i>sup</i> <sup>0</sup> , <i>galK</i> <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , <i>himA42</i>	HUNT & MAGASANIK, 1985
- N99		THOMPSON & MOSIG, 1988
- HN678		THOMPSON & MOSIG, 1988
Plasmídeos:		
pTZ18R/19R	<i>lacZ</i> fl IG Amp <sup>R</sup>	MEAD, SZCZESNA-SKORRUPA & KEMPER, 1986
Hs2400000012-C09	Clone GENOPAR que contém parte do gene <i>rpoN</i> e a <i>orf6</i> de <i>H. seropedicae</i> .	www.genopar.org



pTZRPON	Produto de PCR de 1,5 Kb contendo o gene <i>rpoN</i> em pTZ18R.	Esta tese
pET28a	Vetor de expressão (promotor T7), gera proteína de fusão com His-Tag, Km <sup>R</sup>	Novagem
pET28aRPON	Fragmento de 1,5 Kb <i>NdeI-BamHI</i> contendo o gene <i>rpoN</i> em pET28a. Expressa <i>rpoN</i> de <i>H. seropedicae</i> sob controle do promotor T7.	Esta tese
pRK2013	Tra <sup>+</sup> Km <sup>R</sup>	FIGURSKI & HELINSKI, 1979
pEMS140	Tc <sup>R</sup> Mob <sup>+</sup> . Promotor <i>nifB</i> clonado em pPW452	SOUZA, E. M.
pEMS300	Fragmento de 2,0 Kb <i>SalI</i> contendo o gene <i>nifA</i> e parte do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pTZ18R.	SOUZA et al, 1991b
pMTH <sup>N</sup>	Gene <i>rpoN</i> de <i>K. pneumoniae</i> clonado em pET28a <sup>+</sup> . A expressão do gene <i>rpoN</i> está sob o controle do promotor T7. Cm <sup>R</sup> .	GALLEGOS & BUCK, 1999
pMC71A	Expressa <i>nifA</i> de <i>K. pneumoniae</i> constitutivamente a partir do promotor <i>tet</i> de pACYC184.	BUCHANAN-WOLLASTON et al., 1981.

#### 4. Meios de cultura

*H. seropedicae* foi cultivado em meio NFb como descrito em Machado e colaboradores (1995), mas contendo malato ao invés de lactato. O pH do meio foi ajustado para 6,0. No momento do uso, o meio foi suplementado com 50 mL/L (NFbHP) ou 5 mL/L (NFbLP) da mistura de fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,8 g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 159,5 g/L) e como fonte de nitrogênio foram utilizados 20 mmol/L cloreto de amônio ou 5 mmol/L de glutamato monossódico. O meio NFbHP malato contendo íons amônio foi denominado NFbHPN malato e o meio contendo glutamato, NFbHPG malato.

Os meios NFbHPN malato sólido e semi-sólido possuem a mesma composição que o líquido, mas acrescidos de 1,5 e 0,15% de ágar, respectivamente.

A composição do meio NFb-malato foi a seguinte:

	gramas/litro
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
CaCl <sub>2</sub>	2,0.10 <sup>-2</sup>
Ácido nitrilo triacético	5,6.10 <sup>-2</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0.10 <sup>-2</sup>
Biotina	1,0.10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0.10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,4.10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8.10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	8,0.10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,4.10 <sup>-4</sup>
Ácido málico	5,0

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em Luria-Bertani Broth (LB), Luria-Bertani Agar (LA) (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989), Terrific Broth (TARTOF & HOBBS, 1987) ou NFDM (DIXON et al.,1977).

A composição do meio LB é a seguinte:

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Água q.s.p.	1000 mL

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 mol/L. A composição do meio LA é a mesma do meio LB acrescido de 1,5% p/v de ágar.

O meio Terrific Broth apresenta os seguintes componentes:

Bacto triptona	12 g
Extrato de levedura	24 g
Glicerol	4 mL
Água destilada q.s.p.	900 mL

Após esterilização do meio por autoclavagem, 100 mL da solução de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 mol/L e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,72 mol/L) e glucose (20 mmol/L final) foram acrescentados.

O meio NFDM é um meio mínimo e tem a seguinte composição:

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	25mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25 mg
Glucose	20 g
Água destilada q.s.p.	950 mL

Cinquenta mililitros da solução de fosfatos vinte vezes concentrada (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 241,2 g/L e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 68 g/L) foram adicionadas ao meio NFDM no momento do uso. Quando necessário foi utilizado como fonte de nitrogênio cloreto de amônio (concentração final de 20 mmol/L). Este meio foi suplementado com 5 µg/mL de tiamina.

Para se obter os meios sólido e semi-sólido, os meios líquidos foram acrescidos de 1,5 e 0,15 % de ágar, respectivamente.

As bactérias foram estocadas em meio NFbHP malato semi-sólido a temperatura ambiente ou em suspensão de glicerol 50% a -20°C.

## 5. Purificação de DNA

### 5.1 Mini-preparação de plasmídeo

A purificação de plasmídeos de *E. coli* em pequena escala foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

Alíquotas (1,5 mL) de culturas de *E. coli* cultivadas em meio TB ou LB a 37°C sob forte agitação (220 rpm) por 12-16 horas foram coletadas por centrifugação (13000 rpm por 1 min). A massa celular foi suspensa em 200 µL de uma solução gelada de GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L) e lisada pela adição de 300 µL de uma solução de NaOH 0,2 mol/L contendo 1% de SDS. Para precipitar o SDS, DNA cromossomal, restos celulares e proteínas 300 µL de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 foram acrescentados à mistura que foi homogeneizado e mantida no gelo por 5 minutos. Finalmente, após centrifugação por 10 min a 13000 rpm, ao sobrenadante, transferido para outro tubo, foram adicionados 50 µL de fenol:álcool isoamílico:clorofórmio (25:1:24) para extração de proteínas. Após centrifugação em centrífuga Eppendorf (modelo 5410) (13000 rpm por 5 min), a fase aquosa foi coletada e o DNA plasmidial precipitado com 2,5 volumes de etanol 95% e centrifugados por

aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi submetido a duas lavagens com álcool a 80%, seco à vácuo e ressuspensão em 20 µL de tampão Tris-HCl pH 7,5 10 mmol/L e EDTA 1 mmol/L (T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>).

## 5.2 Maxi-preparação de plasmídeos

A obtenção de plasmídeos em larga escala foi realizada como descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). O procedimento adotado foi semelhante a mini-preparação em maior escala, ou seja, foi utilizado um maior volume de cultura e de reagentes: para 20 mL de cultura foram utilizados 5 mL de GET, 5 mL de tampão de, 5 mL de KAcF e 2,5 mL de fenol:álcool isoamílico:clorofórmio (25:1:24). No restante, o protocolo foi o mesmo, exceto que 0,6 volume de álcool iso-propílico foi utilizado para precipitar o DNA ao invés de 2 volumes de etanol absoluto.

## 5.3. Purificação de DNA total de *Herbaspirillum seropedicae*

As células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos de uma cultura recente de 5 ml de *H. seropedicae* crescida em meio NFBHPN malato. O sedimento foi ressuspensão em tampão GET. Após completa ressuspensão, foi adicionada solução de SDS (10 %) até concentração final de 1% e foi feita incubação de 20 min à 50°C e posteriormente foi adicionada pronase E para uma concentração final de 200 µg/ml. O lisado, após incubação a 37°C por 18 horas, foi desproteínoado várias vezes com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) até não haver mais precipitação de proteína. Posteriormente foi feita mais uma extração apenas com clorofórmio e o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto e lavado com etanol a 80%. Após ser seco a vácuo o DNA foi ressuspensão em 200µl de tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (10 mmol/L de Tris-Hcl pH 7,5 e EDTA 1 mmol/L).

## 5.4. Purificação de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão

A purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão foi realizada pelo corte do fragmento de interesse do gel, após a corrida eletroforética e coloração com brometo de etídio ou azul de metileno 0,025%. A fração coletada foi

adicionado 1 volume de água, 1/5 do volume de Tris-acetato 1 mol/L pH 8,0 e fundida a 65°C por 5 minutos, e o DNA extraído com um volume de fenol tamponado e centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos, a fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo. Um volume equivalente de água ao da fase aquosa removido foi adicionado à fase fenólica para completa extração e centrifugação e reunida a fase aquosa anterior. O DNA foi precipitado pela adição de acetato de amônio 7,5 mol/L (concentração final de 5 mol/L) e dois volumes de etanol absoluto, centrifugado, lavado e seco como já descrito.

### 5.5. Purificação de DNA para reação de seqüenciamento

Os transformantes de *E. coli* estirpe DH10B contendo os plasmídeos pTZ18R recombinantes foram inoculados em 5 mL de meio Terrific Broth com os antibióticos adequados e foram incubados a 37°C sob agitação (200 rpm) até atingirem D.O. 1,5 a 2,0. As células de 1,5 mL de cultura foram coletadas por centrifugação e o plasmídeo purificado (item 5.1 de Material e Métodos). A seguir, a preparação de plasmídeo foi submetida a um tratamento com RNase (1 mg/mL) por 2 horas a 37°C. O segundo passo da purificação consistiu de duas extrações com fenol:clorofórmio, precipitação com etanol absoluto e uma lavagem do DNA precipitado com etanol 80%. O precipitado foi ressuspensão em 8 µL de NaCl 4 mol/L e 30 µL de PEG 8000 13%, deixado por 1 hora em gelo e centrifugado (13000 rpm) por 20 min. Após o precipitado ser lavado com etanol 80%, foi ressuspensão em 10 µL de água ultrapura.

### 6. Eletroforese de DNA em gel de agarose

As eletroforeses de DNA em gel de agarose foram realizadas como descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Os géis foram preparados na concentração desejada, normalmente a 0,7%, em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mmol/L, e EDTA 2 mmol/L pH 8,0) ou TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L, EDTA 1 mmol/L pH 8,0) e as corridas eletroforéticas foram realizadas nos mesmos tampões em que os géis foram preparados. As amostras foram misturadas ao tampão de aplicação FSUDS (azul de bromofenol 0,025%, xilenocianol 0,025%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>) na proporção de 4:1 e aplicadas no gel. A corrida foi desenvolvida entre 25 a 60 V durante

um período que variava conforme a concentração da agarose e o tamanho do DNA. A solução reveladora continha brometo de etídio (0,5 µg/mL) e a visualização das bandas foi feita utilizando um transiluminador ultravioleta de 312 nm. Os eletroforetogramas foram registrados por uma câmera CCD (sistema Biochemi, UVP).

## 7. Digestão de DNA com enzimas de restrição

As condições de digestão pelas diferentes enzimas de restrição respeitaram as recomendações dos fabricantes. Resumidamente, este procedimento consistiu na incubação do DNA e a enzima de restrição na presença do tampão, cofatores e estabilizantes recomendados, em um volume final de restrição variável (em geral 10 a 200 em µL) por um período de 1 a 2 horas a 37°C.

## 8. Ligação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA a serem ligados que possuíam pontas coesivas ou pontas cegas foram misturados na proporção 1:5 (vetor:inserto) em um volume variável (10-30 µL). A mistura de fragmentos foi aquecida durante 10 minutos a 65° C e resfriada rapidamente em gelo. A esta solução foi adicionado tampão ligase (Tris.HCl 50 mmol/L pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L, ATP 0,5 mmol/L, PEG 8000 5%) e a enzima T4-DNA ligase (0,5 a 1 U), e esta mistura foi incubada a 16-22°C por 12-24 horas. Quando necessário, uma alíquota do sistema foi submetido à eletroforese em gel de agarose para verificar o sucesso da reação de ligação. Alternativamente, a reação de ligação foi utilizada diretamente para transformação de estirpes de *E. coli*.

Para clonar produtos de PCR, algumas vezes foi utilizada a capacidade da Taq DNA polimerase de adicionar um resíduo A nas extremidades 3' (devido à incorporação preferencial de dATP) no fragmento amplificado independente de molde, criando uma ponta protrudente. Neste caso, o vetor possuía um resíduo protudente T nas extremidades 3', obtido pelo tratamento do vetor com pontas cegas com Taq DNA polimerase na presença apenas de dTTP. Desta forma, o vetor e o inserto possuíam extremidades complementares. Outras vezes foi utilizada a capacidade da T4 DNA polimerase em converter a extremidade do fragmento de DNA em ponta não-coesiva. Desta forma, primeiramente o produto de PCR foi incubado por 5 minutos com a T4

DNA polimerase na ausência de dNTPs para estimular sua atividade de exonuclease 3' → 5' gerando ponta 5' protudente. Após este tempo foi adicionado os dNTPs e incubado novamente, o que resultou na inibição de sua atividade de exonuclease e estimulação de sua atividade de preenchimento da ponta 3' recessiva até formar extremidade não-coesiva (AUSUBEL et al., 1999).

Para tratar o vetor foi utilizado o seguinte procedimento: ao vetor dissolvido em tampão da enzima Taq DNA polimerase (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol/L KCl), foi adicionado MgCl<sub>2</sub> (1,5 mmol/L), dTTP (0,2 mmol/L) e Taq DNA polimerase (1U), e o volume foi completado para 50 µL. A mistura de reação foi incubada a 72°C por 30 minutos. A reação de ligação foi realizada da mesma forma como descrito acima, mas utilizando uma relação vetor:inserto de 1:10.

#### 9. Transformação bacteriana por choque térmico de *E. coli*

A transformação de *E. coli* com DNA plasmidial foi realizada segundo Chung, Niemela e Miller (1989) com modificações. Primeiramente as células utilizadas para o processo de transformação sofreram um tratamento para se tornarem aptas a receber o plasmídeo, ou seja, competentes. Culturas recentes de estirpes de *E. coli* com D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,05 foram incubadas a 37°C sob forte agitação (200 rpm) até atingir D.O.<sub>600</sub> entre 0,3 a 0,5. As culturas foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm, 4°C por 5 minutos). O sedimento de células foi ressuspensão em tampão TSS (meio LB 85%, PEG 8000 10%, DMSO 7% e MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L pH 6,5) e a suspensão aliquoteada e mantida a -70°C.

Alíquotas de 20 µL das células competentes foram incubadas por 30 min em banho de gelo com 1 a 10 µL o plasmídeo de interesse (aproximadamente 0,1 ng) ou reação de ligação (até 10 ng de DNA). A mistura então foi submetida a um choque térmico (2 minutos em banho-maria a 42°C), seguido de incubação em gelo por mais 15 minutos. A suspensão de células foi então incubada a 37°C por 1 hora com meio de cultura LB e plaqueada em meio LA contendo os antibióticos necessários.

## 10. Transformação bacteriana por choque elétrico de *E. coli* e *H. seropedicae*

A técnica de eletroporação foi realizada conforme descrito pelo fabricante do eletroporador (GIBCO-BRL). No preparo de células eletrocompetentes, culturas de estirpes de *E. coli* ou *H. seropedicae* com D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,02 foram incubadas a 37°C ou a 30°C sob forte agitação (200 rpm) até atingir D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 a 0,8. As culturas foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos, coletadas por centrifugação (3000 rpm, 4°C por 7 a 10 minutos) e lavadas duas vezes com água ultrapura e uma vez com glicerol 15%, todos mantidos a 4° C. As células eletrocompetentes foram ressuspensas em glicerol 15 %, aliquotadas e mantidas a -70°C.

Para eletroporação, as células eletrocompetentes (20 µL) foram misturadas com um volume de 0,5 a 5 µL de plasmídeo de interesse e cuidadosamente colocadas nas cubas de eletroporação para serem submetidas a um choque elétrico rápido (4 KΩ, 400Ω, 320 µF para *E. coli* e 4 KΩ, 200Ω, 320 µF para *H. seropedicae*). Um mililitro de meio LB foi adicionado à suspensão de células que foi incubada por 45 min a 37°C e posteriormente plaqueada em meio sólido LA com os devidos antibióticos quando *E. coli*. Para *H. seropedicae*, um mililitro de meio NFb malato suplementado com 50 mmol/L de uma mistura de fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17,8 g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 159,5 g/L) e 20 mmol/L de cloreto de amônio foi adicionado à suspensão de células que foi incubada por 4 horas a 30°C e posteriormente plaqueada em meio sólido NFbHPN malato com os devidos antibióticos.

## 11. Conjugação bacteriana

A conjugação foi realizada segundo Hanke e colaboradores (1995), com modificações. Primeiramente, 1 mL de cultura de *H. seropedicae* com D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 1,0 a 1,3 foi incubada com de 10 µL de lisozima (20 mg/mL) por 30 minutos a 30°C. Quando a estirpe de *E. coli* doadora não possuía os genes *tra*<sup>+</sup>, volumes iguais de cultura de estirpe de *E. coli* doadora e da estirpe de *E. coli* contendo plasmídeo auxiliar (pRK2013 ou pRK2073) foram misturadas e incubadas por 1 hora a 37°C. Um volume de 50 µL da estirpe de *E. coli* doadora ou da mistura de *E. coli* (doadora + auxiliar) foi adicionado a 1 mL de cultura de *H. seropedicae*, previamente tratada com



lisozima (50 µg/mL). Esta mistura foi então centrifugada por 30 segundos a 13000 rpm e a solução sobrenadante descartada. O precipitado celular foi lavado com sulfato de magnésio 10 mmol/L e centrifugado. As células foram ressuspensas em 50 µL de sulfato de magnésio e a suspensão depositada sobre uma membrana de nitrocelulose em meio sólido contendo NFbHPN malato e LA na proporção de 3:1. As culturas foram então incubadas por 24 horas a 30°C, a massa de células foi ressuspensa em 1 mL de meio NFbHP malato e plaqueada (200 µL) em meio NFbHPN malato seletivo contendo as fontes de carbono e antibióticos necessários.

## 12. Sequenciamento de DNA

O seqüenciamento foi feito pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger, Nicklen e Coulson (1977), utilizando 2',3'-di-deoxinucleotídeos fluorescentes em seqüenciador automático Applied Biosystems ABI PRISM 377.

DNA dupla fita purificados (50-100µg) foram acrescidos de água (q.s.p. 10 µL), 1,0 µL de oligonucleotídeo iniciador (10 pmol) e 4,0 µL de mistura para seqüenciamento ET™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). Esta solução foi então submetida a uma reação de PCR que consistiu dos seguintes passos: 1 ciclo: 95°C - 5 min e 30 ciclos de 96°C - 20 seg, 60°C - 1min e 30 seg. A purificação dos produtos da reação de seqüenciamento foi realizada segundo recomendação do fornecedor do kit de seqüenciamento.

Aos 10 µL de amostra foram acrescentados 10 µL de água estéril e 2,0 µL de acetato de sódio 3 mol/L pH 8,0 (0,3 mol/L) ou 2,0 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L (0,7 mol/L) e 60 µL de etanol absoluto e deixado a temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir, a amostra foi centrifugada (13000 rpm por 30 min), o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol a 80%. O precipitado foi seco a vácuo e dissolvido em 4 µL de solução de formamida deionizada-blue dextran/EDTA (5:1) submetido ao seqüenciador automático Applied Biosystems.

### 13. Inserção de transposon *in vitro*

A mutagênese através da inserção de aleatória transposon Tn5 EZ::TnTET-1 foi realizada conforme descrito pelo fabricante do kit “insertion kit<TET-1> EZ::Tn<sup>TM</sup> (Epicentre Technologies).

### 14. Hibridização de DNA

Os fragmentos de DNA foram transferidos para membranas de náilon ou nitrocelulose segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Após os fragmentos de DNA serem separados eletroforéticamente, o gel de agarose foi tratado com soluções desnaturante (NaOH 0,5 mol/L e NaCl 1,5 mol/L) e neutralizante (Tris. HCl 1,0 mol/L e NaCl 1,5 mol/L, pH 8,0) consecutivamente por períodos de trinta minutos. Quando se tratava de fragmentos de alta massa molecular, o gel foi previamente tratado com uma solução de HCl 0,25 mol/L durante 5-10 minutos, dependendo das dimensões do gel.

A transferência do DNA para a membrana de náilon foi feita por capilaridade (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989) ou a vácuo utilizando o aparelho VacuGene (GE HealthCare).

As membranas contendo DNA foram pré-incubadas a 65° C em 5-10 mL de solução de hibridização (tampão fosfato de sódio pH 7,0 0,1 mol/L contendo 2% de SDS). A sonda marcada com [<sup>32</sup>P] foi desnaturada por aquecimento a 95° C por 5 minutos, rapidamente resfriada em gelo e adicionada ao tampão hibridização. O sistema foi incubado por 24-48 horas a 65° C com agitação constante.

Por fim, as membranas foram lavadas com tampão SSC 2X (8,2 g/L de citrato de sódio e 17,53 g/L de NaCl ajustado o pH para 7,0 com NaOH 10 mol/L) contendo 0,1% de SDS a 60°C por 15 minutos, também com agitação. A revelação dos híbridos foi feita por exposição em placas sensíveis a radiação (Kodak storage phosphor screen S0230 GE HealthCare) e reveladas em PhosphorImager Storm 820 (GE HealthCare) ou por autorradiografia.

### 15. Captação de [<sup>14</sup>C]metilamônio

As células foram crescidas em meio NFbLP malato suplementado com 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl (excesso de nitrogênio) ou 2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl (nitrogênio

limitante) a 30°C em 120 rpm por 15 horas. Após este período as células foram coletadas em uma D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 1,2, as células foram lavadas e ressuspensas para o volume original com meio NFbLP malato sem nitrogênio. Para a realização do ensaio, as células foram pré-incubadas por 5 minutos a 30°C antes da adição de 10 µmol/L de [<sup>14</sup>C]metilamônio (atividade específica de 0,546 µCi/mol). Amostras de 50 µL foram retiradas em tempos específicos (1; 2,5; 5; 10; 15 e 20 minutos), rapidamente filtradas por membrana de náilon (Hybond N+, tamanho do poro 0,45 µm), e lavadas 5 vezes com meio NFb-malato. A radioatividade foi medida em PhosphorImager (Storm 820 GE Healthcare) ou em um contador de cintilações (Beckman) por um período 10 minutos.

## 16. Crescimento em diferentes fontes de nitrogênio e carbono

As células foram crescidas em meio NFbHP malato suplementado com 2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl a 30°C e 120 rpm por 15 horas. Após este período as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensa em meio sem nitrogênio fixado (D.O.<sub>600</sub> de 0,5) e inoculadas em placas de NFbHP malato sólido suplementado com 5mmol/L de um dos seguintes aminoácidos: arginina, histidina, glutamina, glutamato, leucina, hidroprolina ou 5 mmol/L de uréia ou 10 mmol/L de nitrato como fonte de nitrogênio.

Para o ensaio de crescimento em diferentes fontes de carbono as células foram crescidas em meio NFbHP malato suplementado com 4 mmol/L de glutamato de sódio a 30°C em 120 rpm por 15 horas. Após este período as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensa em meio sem fonte de carbono (D.O.<sub>600</sub> de 0,5) e inoculadas em placas de NFbHP sólido suplementado com 20 mmol/L de cloreto de amônio e as seguintes fontes de carbono: malato (0,5%), glucose (1%), succinato (0.5%) ou citrato (0.5%).

## 17. Ensaio de motilidade

As células foram crescidas em meio NFbHP malato suplementado com 2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl a 30°C em 120 rpm por 15 horas. Após este período as células foram por centrifugação e ressuspensa em meio sem nitrogênio fixado (D.O.<sub>600</sub> de 0,5). Um volume de 10 µL da suspensão de células foi inoculado em placas de NFbHP

malato semi-sólido na ausência de fonte de nitrogênio ou na presença de 20 mmol/L de cloreto de amônio ou 0,5 mmol/L de glutamato de sódio. Os halos de crescimento foram monitorados por 48 horas. Além disso, um volume de 100 µL da suspensão de células foi inoculado em meio NFbHP malato semi-sólido suplementado 20 mmol/L de cloreto de amônio, ou com 0,5 mmol/L de glutamato de sódio ou na ausência de fonte de nitrogênio. O tempo de formação de película foi monitorado por 48 horas.

#### 18. Determinação da atividade de glutamina sintetase (GS)

A atividade biossintética da glutamina (GS) sintetase foi determinada como descrito por Bender e colaboradores (1977) com modificações. Os ensaios foram realizados em micro-escala e o tampão imidazol foi substituído por HEPES (GOLDBERG & HANAU, 1979). As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHP malato suplementado com 20 ou 2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl, ou 5 mmol/L de glutamato a 30°C em 120 rpm. Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi então adicionado às culturas em uma concentração final de 100 µg/mL. Após 5 minutos 3 mL de cada cultura foi centrifugada e as células foram lavadas com 1 mL de solução de KCl (1%) e ressuspensas em 50 µL da mesma solução. Posteriormente, 10 µL da suspensão de células tratadas com KCl foram adicionadas em 65 µL de tampão de GS biossintética (0,125 mol/L de HEPES pH 8,0, 47 mmol/L de hidrocloreto de hidroxilamina, 56 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 168 mmol/L de L-glutamato e 94 µg/mL de CTAB). A reação de medida da atividade foi iniciada com a adição 10 µL de 0,2 mol/L de ATP (ajustado para pH 7,7). Após 20 minutos a 37°C, a reação foi encerrada com a adição de 165 µL mistura de parada (55 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; 20 g de ácido tricloroacético e 21 mL de HCl concentrado por litro). A absorbância foi determinada em 540 nm. A atividade biossintética de GS foi expressa em µmol/L de  $\gamma$ -glutamil- hidroxamato/(D.O.<sub>540</sub>/mg proteína).

#### 19. Purificação das proteínas RpoN de *K. pneumoniae* e *H. seropedicae*

Para a obtenção do gene completo *rpoN* de *H. seropedicae* foi sintetizado oligonucleotídeos iniciadores que anelavam a região N-terminal (5' CCAGAAAGACATATGAAACAG 3', as bases sublinhadas foram trocadas) e C-

terminal (5' TCAGCGGGATCCTTGCC 3', as bases sublinhadas foram trocadas) contendo os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, respectivamente. DNA genômico de *H. seropedicae* (50 µg) foi acrescidos de água (q.s.p. 25 µL), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol), 1,5 µL de dNTP (5 mmol/L), 0,5 µL de MgSO<sub>4</sub> (50 mmol/L), 0,5 µL de Pfx DNA polimerase (2,5 U/µL) e 2,5 µL de tampão de amplificação da Pfx DNA polimerase (10X). Esta solução foi então submetida a uma reação de PCR que consistiu dos seguintes passos: 1 ciclo: 94°C - 5 min e 35 ciclos de 94°C - 15 seg, 38°C - 30 seg, 68°C - 3min e 30 seg. O fragmento de DNA amplificado foi clonado em pTZ18R digerido com a enzima *SmaI* produzindo o plasmídeo pTZRPON. Este plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e o fragmento resultante foi clonado no pET28a produzindo pET28aRPON.

Estirpe de *E. coli* BL21 (λDE3) contendo o plasmídeo pETRPON (RpoN de *H. seropedicae*) foi crescida em 500 mL de meio LB (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989), com canamicina (50 µg/mL) a 37°C até D.O.<sub>600</sub> de 0,1 (após 3 h). A expressão de RpoN foi induzida com IPTG (0,1mmol/L) por 5 horas. As células foram mantidas em gelo por 10 minutos e posteriormente centrifugadas. O extrato de células foi ressuspenso em 5 mL de tampão A (25 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,0; 5% de glicerol e 500 mmol/L de NaCl) com adição de 0,2 mmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMFS), e lisadas usando prensa francesa (1400 psi). A fração solúvel obtida foi centrifugada a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C e foi tratada pelo método descrito por Gallegos e Buck (1999). A proteína RpoN foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna Ni<sup>+2</sup>-NTA (High Trap Chelating, GEHealth Care) e eluída com gradiente de imidazol. As frações contendo a proteína purificada foram dializadas em tampão TGED (10 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mmol/L de DTT; 0,1 mmol/L de EDTA; 50% de glicerol e 50 mmol/L de NaCl).

A proteína RpoN de *K. pneumoniae* foi purificada de acordo com Gallegos e Buck (1999).

As proteínas NifA de *Azotobacter vinelandii* e IHF de *E. coli* foram purificadas por Wasseem e colaboradores (2000) como descrito por Nash e colaboradores (1987) e Wang e colaboradores (1997a).

## 20. Ensaio de retardamento eletroforético do *pnifB* pelas proteínas RpoN e IHF

Este ensaio foi realizado segundo Feng e colaboradores (1995) e Rickwood e Hames (1990).

As proteínas RpoN de *H. seropedicae* e *K. pneumoniae* e IHF de *E. coli* foram incubadas em tampão TAP (50 mmol/L Tris acetato pH 8,0, 100 mmol/L de acetato de sódio, 8 mm/L de acetato de magnésio, 27 mmol/L de acetato de amônio, 1 mmol/L de ditionitrosol e 3,5% de PEG 8000) (POPHAM et al., 1989) com 3,2 µg/µL DNA Hering ou 3,0 µg/µL DNA Timo por 5 minutos a 30 °C. Fragmentos de DNA de 368 bp ou 265 bp contendo a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* (4 ou 9 nmol/L) marcados com [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP foram incubados por 10 minutos a 30 °C. As amostras foram misturadas (1:2) com tampão de aplicação (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 100 de EDTA mmol/L, 40 % glicerol e 0,001 % de azul de bromofenol) antes da aplicação em gel de poliacrilamida (4%) e foram submetidas a eletroforese por 2 horas a 80 V em 4°C. Os géis foram secos e a marcação radioativa foi detectada por PhosphorImager (Molecular Dynamics).

O fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *nifB* foi obtida por amplificação da região promotora do gene utilizando os oligonucleotídeos iniciadores p11 (5'-GTATTAATGGATTCCCCGGC-3') e p12 (5'-TCCAGCAAGGTGCCTAGCG-3'). Este fragmento (345 bp) foi tratado com T4 DNA polimerase para ficar com pontas cegas (item 8 de Material e Métodos) para ser clonado no vetor pTZ18R digerido com a enzima de restrição *SmaI* para produzir pTZPNIFB. O promotor *nifB* foi então isolado como um fragmento *EcoRI* e *BamHI* (368 bp) do plasmídeo pTZPNIFB ou como fragmento *BssHIII* (265 bp) do fragmento de DNA obtido por PCR (345 pb) e posteriormente marcado com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP usando o fragmento maior da DNA polimerase (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

Para a marcação radioativa foi utilizado em torno de 50 pmol/L de promotor do gene *nifB* (fragmento *EcoRI* e *BamHI* de 368 bp ou *BssHIII* de 265 bp), 0,2 mmol/L dos nucleotídeos dATP, dGTP e dTTP, 2 U/L de Klenow, 10 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP em tampão L USB 1X e 1 U de enzima Klenow para preenchimento das pontas. Esta mistura foi incubada a 30°C por 1 hora.

## 21. Ensaio de proteção com DNase I

As interações DNA-proteína foram monitoradas pelo ensaio de proteção pela DNase I como descrito por Wassem e colaboradores (2000). A marcação radioativa do fragmento contendo o promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi feita através da amplificação desta região utilizando oligonucleotídeos iniciadores marcados com [ $\gamma$ - $^{32}$ P] rATP. Cinquenta pmols do oligonucleotídeo iniciador p11 foi marcado num sistema contendo 10 U de T4 polinucleotídeo quinase (Gibco), tampão (70 mmols/L Tris-HCl pH 7,6, 10 mmols/L MgCl<sub>2</sub>, 1000 mmols/L KCl e 1 mmol/L 2-mercaptoetanol) e 10  $\mu$ Ci de [ $^{32}$ P]  $\gamma$ ATP, e incubado a 37° C por 1 hora (AUSUBEL et al., 1999). A região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi então amplificada com os oligonucleotídeo iniciador p11 marcado como descrito acima. Na reação de PCR foi utilizado como molde o plasmídeo pEMS300 e o fragmento obtido foi de aproximadamente 345 pares de base. O sistema de reação continha 14,4  $\mu$ g de DNA molde, 4,0  $\mu$ L de dNTP (5 mmol/L), 1,0  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/ $\mu$ L de p12 e 2,5 pmol/ $\mu$ L de p11 marcado), 10,0  $\mu$ L de tampão de PCR concentrado 10 vezes (200 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 500 mmol/L KCl), 3,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol/L), 79  $\mu$ L de água (q.s.p. 100  $\mu$ L) e 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase (1U). O programa para a amplificação consistiu dos seguintes passos: 95°C-5 min um ciclo; 94°C-20 seg, 52°C-30 seg e 72°C-30 seg 30 ciclos; e 72°C-10 min um ciclo.

Após a pré-incubação do fragmento de DNA marcado em tampão TAP com concentrações crescentes de proteína IHF por 10 minutos a 30°C, 0,025 U de DNase I foi adicionada em cada amostra e seguida de incubação por 3 minutos. As reações foram interrompidas com 8  $\mu$ L de uma solução contendo 500 mmol/L de EDTA, 0,5 mg/mL de tRNA. Logo a seguir as reações foram precipitadas com etanol, secas e ressuspensas em um volume de água e tampão de aplicação equivalentes a 3  $\mu$ L. As amostras foram aquecidas a 90°C e eletroforizadas em gel desnaturante de sequenciamento a 6% (contendo 8 mol/L de uréia) em TBE 1X.

## 22. Transcrição *in vitro*

O promotor *nifB* de *H. seropedicae* amplificado por PCR foi usado como molde para transcrição *in vitro* como Wassem e colaboradores com modificações (2000). O promotor (10 nmol/L) foi pré-incubado por 1 min em tampão TAP (50mmol/L de Tris-acetato pH 8,0, 100 mmol/L acetato de potássio, 8mmol/L acetato de magnésio, 7 mmol/L acetato de amônio, 1mmol/L de ditiotreitól e 3.5% PEG 8000) com 4 mmol/L de GTP, 100 mg/mL de albumina bovina, 2 U/mL de inibidor de RNase. A esta mistura foi adicionado a holoenzima RNA polimerase e após 5 min de incubação concentrações crescentes da proteína IHF foram adicionadas e a mistura incubada por mais 3 min a 30°C. Os ensaios continham 40 nmol/L de RNA polimerase- $\sigma^{54}$  (1 parte do núcleo da RNA polimerase de *E. coli*:3 partes de  $\sigma^{54}$ ). A proteína ativadora (NifA de *A. vinelandii* – 750  $\mu$ mol/L) foi adicionada ao sistema que foi incubado por 20 min para promover a formação do complexo aberto. À mistura foi adicionado ATP e CTP (85  $\mu$ mol/L), 2  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP e 85  $\mu$ g/mL de heparina, incubando-se por mais 10 min. Um excesso de UTP (85  $\mu$ mol/L) foi adicionado e incubado por mais 10 min. para permitir que a cadeia de RNA fosse completada. O RNA foi precipitado com etanol, dissolvido em água (3  $\mu$ L), misturado com 3  $\mu$ L de tampão aplicação (95% de formamida, 20 mmol/L de EDTA, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de azul de xilenocianol) e aquecido a 90°C por 3 min. A amostra foi eletroforizada em gel desnaturante de seqüenciamento a 6 % (contendo 434 mol/L de uréia em TBE 1X).

## 23. Outros métodos

### 23.1. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada como descrito por Lowry e colaboradores (1951) ou Bradford (1976). O padrão utilizado foi a albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich).



### 23.2. Quantificação de DNA por espectrofotometria

A concentração de DNA foi determinada empregando a seguinte relação: a absorvância em 260 nm igual a 1,0 corresponde a concentração de 50µg/mL de DNA dupla fita ou de 37 µg/mL de DNA simples fita (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989). As soluções de ácidos nucleicos foram consideradas puras quando apresentavam uma relação  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 a 2,0.

### 23.3. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante

O método utilizado foi o descrito por Laemmli (1970). O gel tinha 0,75 mm de espessura e a concentração de poliacrilamida no gel de empilhamento foi de 4% e no gel separador de 12 a 17%, dependendo da massa molecular da proteína a ser analisada. A relação acrilamida:bis-acrilamida foi de 29,2:0,8. A corrida foi realizada em voltagem constante (200 V) por 45 minutos em aparelho Mini-Protean 3 cell (Bio-Rad).

### 23.4. Determinação da atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método da redução de acetileno a etileno, como descrito por Pedrosa e Yates (1984). O etileno foi dosado utilizando um cromatógrafo a gás Varian 2440D equipado com coluna Porapak N e detector de ionização de chama (temperatura da coluna: 140 °C; temperatura do detector: 200 °C; pressão nitrogênio: 80 psi, pressão de ar comprimido: 40 psi e pressão de hidrogênio: 40 psi).

Foram utilizados frascos de 10 mL de capacidade (tipo penicilina) contendo 4 mL de meio NFbHP malato semi-sólido suplementado com 0,5 mmol/L de glutamato. Dez microlitros de uma cultura fresca de *H. seropedicae* foram inoculados a cada frasco, que foram incubados por 24-48 horas (até que película migrasse até a superfície do meio). Os frascos foram então fechados com rolhas de borracha, injetados com acetileno (10% da fase gasosa), e incubados por 1 hora a 30° C. Meio mililitro da fase gasosa foi analisado por cromatografia líquido-gás. Uma solução de etileno (100%) em nitrogênio super-seco (White-Martins) foi utilizada como padrão.

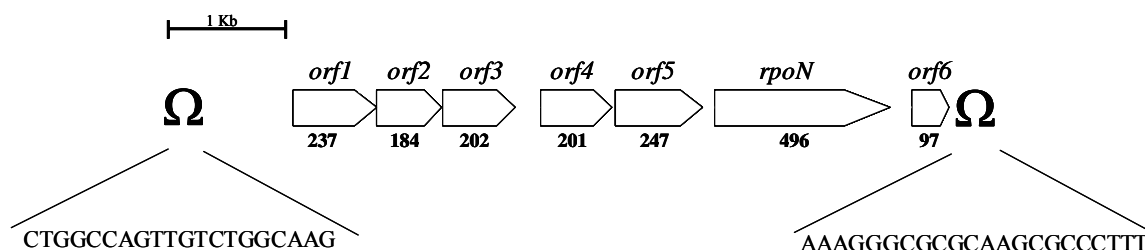
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a interpretação dos resultados esta sessão foi subdividida em quatro partes: análise do operon *rpoN* de *H. seropedicae*, construção e caracterização fisiológica do mutante *rpoN*, caracterização do promotor *nifB* de *H. seropedicae* e purificação e caracterização da atividade da proteína RpoN de *H. seropedicae*.

### 1. Análise do operon *rpoN* de *H. seropedicae*

Em diversas espécies tem sido identificados 2 a 12 genes no operon *rpoN*. Embora a organização genética varie, as seqüências destas ORFs são altamente conservadas. A análise do contíguo 273 do banco de dados da seqüência genômica de *H. seropedicae* do Programa Genopar (Programa Genoma do Paraná - www.genopar.org) indicou que *rpoN* é o sexto gene de um operon com sete genes (Figura 4).

Figura 4. Organização estrutural do operon *rpoN* de *H. seropedicae*



*orf1*: Produto gênico que apresenta homologia com uma isomerase de fosfoaçúcar envolvida na formação de cápsula (*gutQ*)  
*orf2*: Produto gênico que apresenta homologia com uma fosfatase de baixa especificidade da superfamília HAD (*yrbI*)  
*orf3*: Produto gênico que apresenta homologia com uma proteína transmembrana conservada em bactérias não caracterizada  
*orf4*: Produto gênico que apresenta homologia com uma proteína com peptídeo sinal conservada em bactérias não caracterizada (*ostA*)  
*orf5*: Produto gênico que apresenta homologia com o componente ATPase de um transportador tipo ABC (*yhbG*)  
RpoN: Fator sigma 54, subunidade especial da RNA polimerase  
*orf6*: Produto gênico que apresenta homologia com uma proteína moduladora do fator sigma 54, proteína Y associada ao ribossoma (Psrp-1)  
Ω: Terminador transcripcional

Fig. 4. A figura mostra a organização genética das regiões adjacentes ao gene *rpoN* de *H. seropedicae*. As ORFs, que não apresentam função conhecida, estão mostradas como retângulos com pontas para indicar a direção de transcrição. O número de aminoácidos de cada proteína está indicado abaixo da figura. Em parênteses estão os genes mais semelhantes as ORFs. O símbolo Ω representa as prováveis seqüências terminadoras encontradas a montante da *ORF1* e a jusante da *ORF6* e suas seqüências estão mostradas no inserto.

O primeiro gene deste operon codifica para uma isomerase de fosfoaçúcar, seguido por uma fosfatase da superfamília HAD, uma proteína transmembrana, uma provável proteína de membrana e uma ATPase semelhante a de transportadores tipo ABC. Cento e cinquenta e três pb a jusante de *rpoN* foi identificado um gene, que embora não tenha função estabelecida, é bem conservado entre as espécies bacterianas (Figura 5). Sequências terminadoras transcricionais *rho*-independentes foram encontradas a montante do gene que codifica para a provável isomerase de fosfoaçúcar e a jusante do gene que codifica para a proteína moduladora do fator  $\sigma^{54}$  (Figura 4). Esta organização genética é idêntica à encontrada em *Ralstonia solanacearum* e *Xylella fastidiosa* (SALANOUBAT, et al., 2002; Van SLUYS et al., 2003).

Em *H. seropedicae* o primeiro gene que compõe o operon *rpoN* codifica uma proteína que apresenta alta identidade com uma isomerase de fosfoaçúcar envolvida na síntese de cápsula em *Ralstonia eutropha* (71 % de identidade). O segundo gene, que codifica uma fosfatase de baixa especificidade da superfamília HAD, possui 58% de identidade com a proteína ortóloga de *Ralstonia solanacearum*, 51 % com a de *A. vinelandii* e 44% com a de *E. coli*. Em seguida, foi identificado um gene que codifica uma proteína transmembrana não-caracterizada de função desconhecida em bactérias e apresenta identidade de 36% com uma de *Ralstonia metallidurans* e 21% com a de *E. coli*. O quarto gene do operon é semelhante ao *ostA* de *E. coli*, que codifica uma proteína com peptídeo sinal, apresenta identidade de 45% com a de *Ralstonia metallidurans*, 34% de *E. coli* e 28% de *A. vinelandii*. Imediatamente a montante do gene *rpoN*, encontra-se um gene similar ao *yhbG* de *E. coli* que provavelmente codifica uma ATPase semelhante ao componente transdutor de energia de transportadores tipo ABC. Esta proteína apresenta 79%, 77% e 59% de identidade com as proteínas de *Burkholderia cenocepacia*, *Ralstonia metallidurans* e *E. coli*, respectivamente. À jusante ao gene *rpoN* e constituindo o último gene do operon, foi encontrada *orf6* que codifica uma proteína semelhante a proteína ribossomal Y. Esta proteína apresenta alta identidade (70%) com uma proteína de *Rubrivivax gelatinosus*, cujo gene está localizado a jusante de *rpoN* neste organismo (Genbank). Merrick e Coppard (1989) mostraram evidências de que uma ORF homóloga à *orf6* de *H. seropedicae* em *E. coli* (40% de identidade) é capaz de reprimir a expressão de genes *rpoN*-dependentes, o que sugere que esta proteína poderia ser moduladora do fator  $\sigma^{54}$ . Estes genes que potencialmente são cotranscritos com *rpoN* codificam produtos gênicos altamente conservados em outros organismos, como *Shewanella oneidensis*, *Photobacterium*

*profundum*, *Vibrio cholerae*, *Photobacterium luminescens*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas putida* (Figura 4). No entanto, nestes organismos o gene *ptsN* está invariavelmente presente no operon *rpoN*; em alguns organismos ocorre também uma *orf* conservada e o gene *ptsH* (MERRICK & COPPARD, 1989; KULLIK et al, 1991; EHRT, ORNSTON & HILLEN, 1994; JIN, ISHIMOTO & LORY, 1994; FLEISCHMANN et al, 1995; POWELL et al., 1995; JANAKIRAMAN & BRUN, 1997; MICHIELS et al., 1998). A conservação da organização estrutural de genes e operons em procariotos é característica indicativa de que seus produtos têm função correlata ou que seus produtos interagem fisicamente (DANDEKAR et al., 1998). Assim, Janga e Moreno-Hagelsieb (2004) mostraram através de análises computacionais de seqüências genômicas de procariotos que a conservação de genes adjacentes constitui uma evidência de operons parálogos. Estes autores, contudo, identificaram a conservação da organização física de quatro pares de genes em *E. coli* sem aparente relação funcional; um destes pares é *yhbG* (16131091)/*rpoN*. O gene *yhbG* codifica para uma proteína de 27 KDa que possui similaridade com um cassete de ligação ao ATP de um transportador tipo ABC. Contudo, os demais genes contidos no operon *rpoN* não codificam para um transportador ABC. Estudos realizados por Stenberg e colaboradores (2005) revelaram que a proteína YhbG faz parte de um complexo protéico de aproximadamente 140 KDa. A conservação da organização estrutural dos genes a montante e a jusante de *rpoN* em um operon sugere então uma possível interação física e funções relacionadas entre os produtos deste genes (MUSHEGIAN & KOONIN, 1996; DANDEKAR et al., 1998; OVERBEEK et al., 1999; JANGA & MORENO-HAGELSIEB, 2004). Uma hipótese plausível é que os produtos destes genes teriam uma função regulatória e atuariam modulando a atividade de RpoN. Uma vez que o produto de dois destes genes provavelmente são direcionados a membrana, a formação de um complexo com RpoN poderia promover a sua remoção do citoplasma em resposta a um sinal celular, e conseqüentemente controlando os seus níveis e a expressão de genes RpoN-dependentes. A sugestão de que os genes adjacentes a *rpoN* têm função regulatória é reforçada pelo fato de que a *orf* imediatamente a jusante de *rpoN* codifica para uma proteína altamente conservada e que provavelmente exerce função regulatória na expressão de alguns genes  $\sigma^{54}$ -dependentes (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIAN, 1987; RONSON et al., 1987a; INOUE et al., 1989; MERRICK & COPPARD, 1989).

Figura 5. Organização estrutural da região *rpoN* em diversas espécies bacterianas.

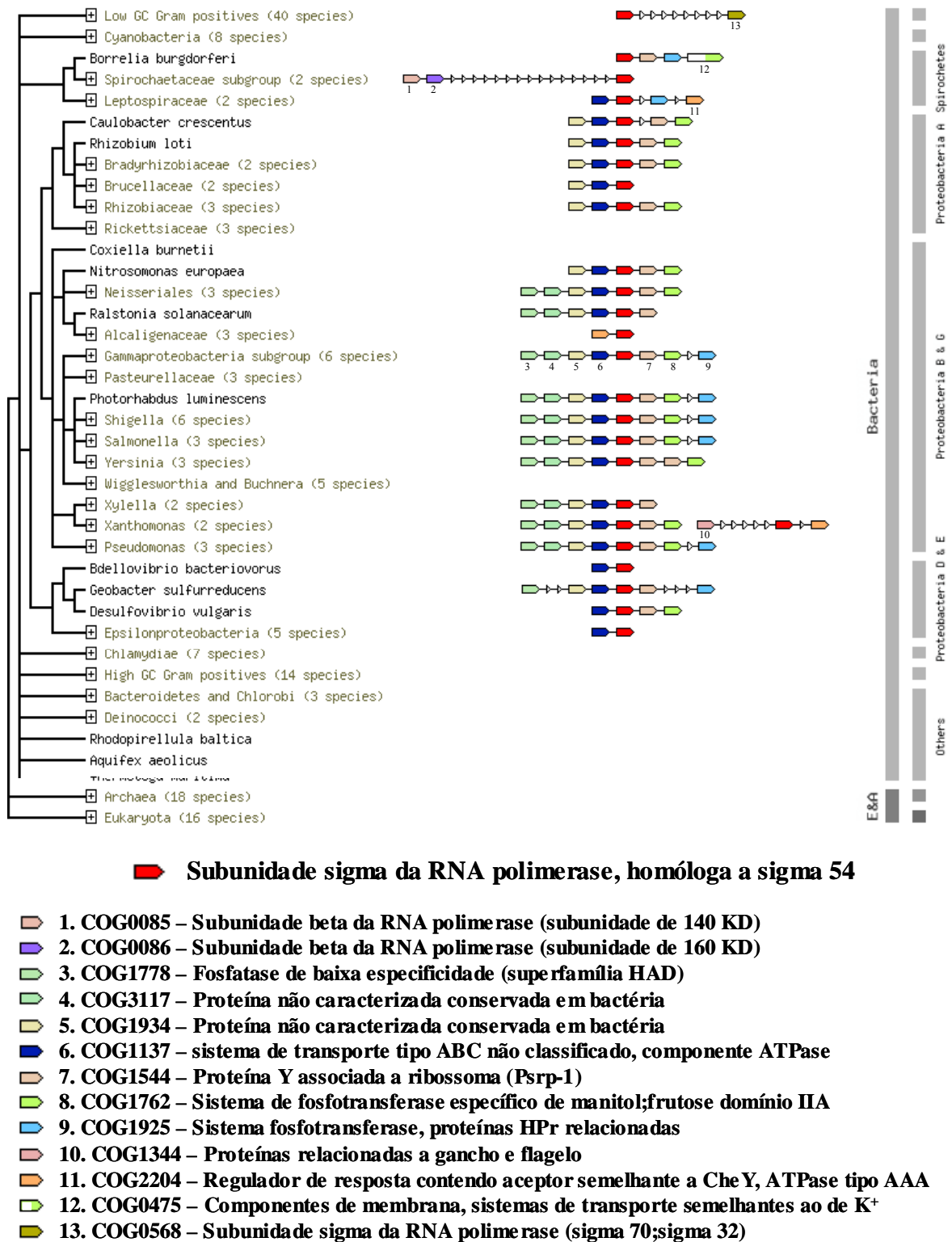


Fig.5. Conservação organizacional das regiões *rpoN* de diversas espécies bacterianas obtida pelo programa String: *functional protein association networks*. ORFs estão mostradas como retângulos com pontas para indicar a direção de transcrição. Componentes ortólogos estão

indicados pela mesma cor e correspondem aos genes que codificam para proteínas indicadas abaixo da figura.

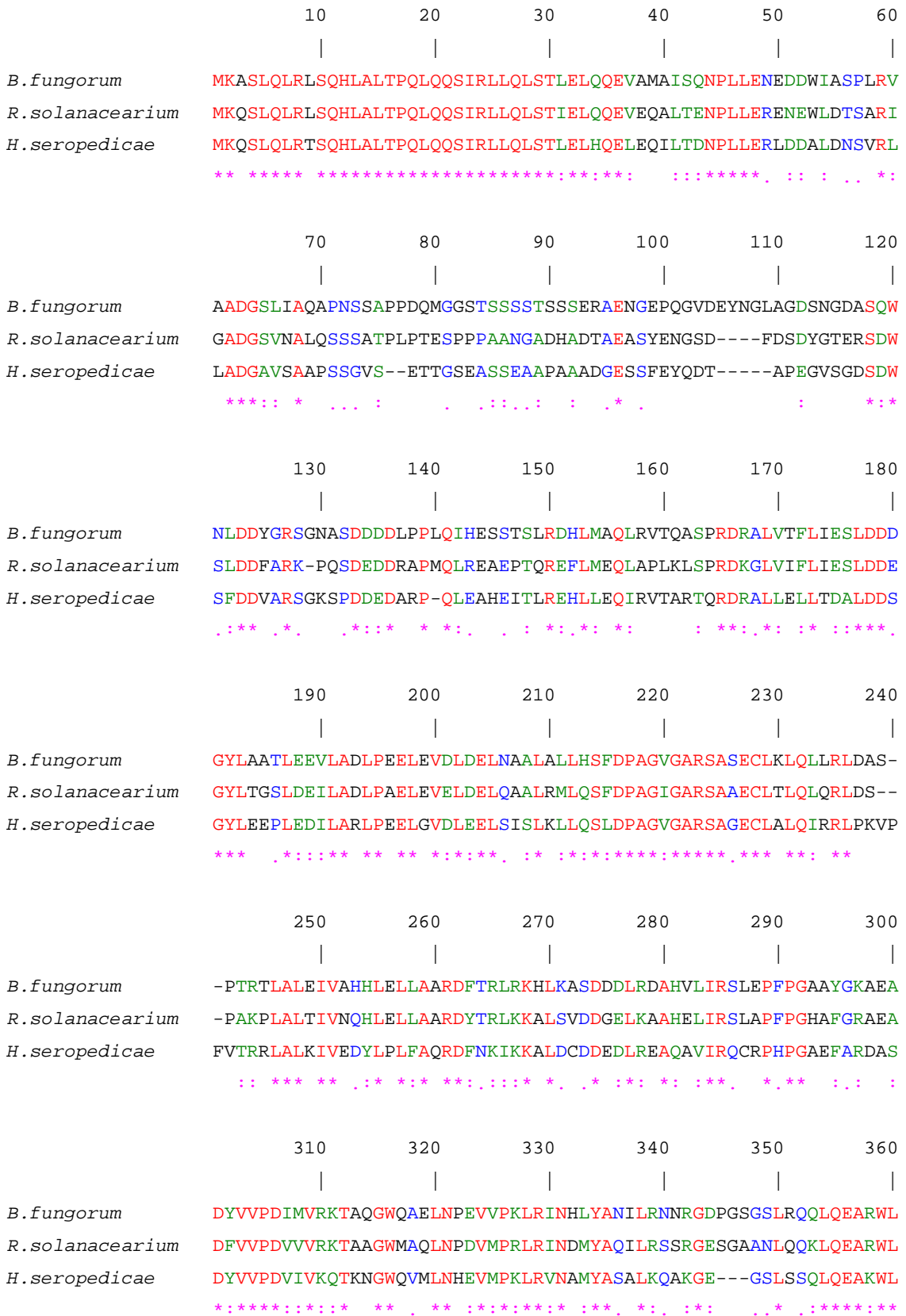
Fonte: <http://string.embl.de/>

Foi realizada a análise da região a montante da ORF1 (427 pb) para a determinação da presença de uma região promotora utilizando o programa PROMSCAN (<http://www.promscan.uklinux.net>). Não foi identificada nenhuma provável seqüência promotora dos tipos  $\cdot N$  ou  $\cdot 70$  (espaçamento de 15 a 19 nucleotídeos) com um escore igual ou superior a 80%.

O gene *rpoN* de *H. seropedicae* codifica para uma proteína ácida (ponto isoelétrico calculado, 5,25) de 496 aminoácidos com a massa molecular estimada em 55.041 Da. Forte conservação de resíduos de aminoácidos foi encontrada entre RpoN de *H. seropedicae* e RpoN de *Burkholderia fungorum* (59% de identidade) e *Ralstonia solanacearum* (59% de identidade) (Figura 6).

Foi possível determinar os três domínios conservados na proteína RpoN de *H. seropedicae*. O domínio I, constituído pelos primeiros 50 aminoácidos da região N-terminal, é rico em resíduos de leucina (L) e glutamina (Q). O domínio II, que compreende 60 a 110 resíduos pouco conservados, mas com alta proporção de resíduos ácidos (D e E). Na região C-terminal (domínio III) foi possível localizar: a) o motivo hélice-volta-hélice (HVH) conservado entre os resíduos de aminoácidos 398 e 417 (LRETADTLGLHESTISRVT) e que está implicado na ligação com a região promotora na posição -24/-12 (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIN, 1987; DODD & EGAN, 1990); b) uma seqüência altamente conservada de 10 aminoácidos (ARRTVAKYRE) entre os resíduos 485 a 494, denominada motivo RpoN-box, (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIN, 1987; WÖSTEN, 1998). Na região C-terminal das proteínas RpoN o motivo hélice-volta-hélice é constituído de 20 aminoácidos, sendo que há uma conservação de 4 aminoácidos entre os 10 primeiros e os 10 últimos são praticamente todos conservados (DODD & EGAN, 1990).

Figura 6. Comparação entre as seqüências de aminoácidos das proteínas RpoN de *H. seropedicae*, *Burkholderia fungorum* e *Ralstonia solanacearum*.



```

           370       380       390       400       410       420
           |         |         |         |         |         |
B. fungorum   IKNIQRFETILRVAQAIVERQKSFVHGEIAMRPLVLREIADTLGLHESTVSRVTTGKY
R. solanacearium IKNIQRFDTILRVSAIVERQKSFVTHGEIAMRPLVLREIADTLGLHESTISRVTTNKY
H. seropedicae IKNMRQRFDTILRVAQAIVERQRNFFSHGAVAMRPLVLREIADTLGLHESTISRVTTQKY
          ***:***:*****:*****;. **  *  ;*****:***** **

           430       440       450       460       470       480
           |         |         |         |         |         |
B. fungorum   MLTPFGTLEFKYFFGSHVSTDTGGAASSTAIRALIKQLIGAENPKSPLSDSRIAELLAEQ
R. solanacearium MATPMGTFELKYFFGSHVSTETGGAASSTAIRALIKQLVGAEDPKNPLSDSRIAELLGEQ
H. seropedicae MLTPHGMFELKYFFGSHVATEETGGEASSTAIRALIKQLIGAENPQTPLSDSKIADMLAEQ
          * * *  :*:*****:*:**  *****:***:*. *****:***:*. **

           490       500
           |         |
B. fungorum   GFVVARRTVAKYREALKIPAVNLRKSL
R. solanacearium GFVVARRTVAKYREALKIPAVNLRKSL
H. seropedicae GMVVARRTVAKYREVLKIPPVNLRKSL
          *:*****.***.*****

```

Fig. 6. As seqüências de aminoácidos foram deduzidas da seqüência de nucleotídeos dos genes *rpoN* e alinhadas. Alinhamento foi de 507 resíduos de aminoácidos, com identidade global (259 resíduos absolutamente conservados indicados por asterisco) de 51,08%; os resíduos que apresentaram alta similaridade (:) foram 92 ou 18,15%; os resíduos com fraca similaridade (.) foram 42 ou 8,28%; 114 resíduos de aminoácidos foram diferentes (22,49%). A seqüência de *B. fungorum* tem 505 resíduos, de *R. solanacearium* tem 499 resíduos e de *H. seropedicae* tem 496 resíduos. A identidade foi determinada como a relação entre o número de resíduos de aminoácidos conservados e o número de resíduos de aminoácidos totais do alinhamento enquanto que a similaridade é dada pela relação do número de resíduos conservados somados às substituições por aminoácidos do mesmo grupo pelo número de resíduos do alinhamento. As seqüências de aminoácidos das proteínas RpoN de *B. fungorum* (gi: 48786500) e *R. solanacearium* (gi: 83746568) foram obtidas a partir das seqüências de nucleotídeos contidas no banco de dados de seqüência (Genbank).

Em *H. seropedicae*, *R. solanacearium* e *B. fungorum* o aminoácido da posição 7 (alanina) é substituído por treonina e o da posição 10 (metionina) por leucina. Embora a substituição na posição 7 não ocorra entre aminoácidos de mesmo grupo, esta posição corresponde ao último aminoácido da hélice antes de iniciar a volta. Além disso, Merrick e Chambres (1992) mostraram que os resíduos de aminoácidos que interagem



com o par de base conservado GG são os resíduos de glutamina (12), serina (13), serina (16) e arginina (17) presentes na segunda hélice do motivo, todos conservados na proteína *RpoN* de *H. seropedicae* (Figura 7).

Figura 7. Alinhamento da seqüência de aminoácidos do motivo HVH

<i>B. fungorum</i>	LREIADTLGL	HESTVSRVTT
<i>R. solanacearium</i>	LREIADTLGL	HESTISRVT
<i>H. seropedicae</i>	LREIADTLGL	HESTISRVT
<i>K. pneumoniae</i>	LADIAQAVEM	HESTISRVT
	1            10	11            20

Fig.7. Aminoácidos que compõe o motivo HVH das proteínas RpoN de *B. fungorum*, *R. solanacearium*, *H. seropedicae* e *K. pneumoniae*. Em azul estão demonstrados os resíduos conservados que interagem com o par conservado GG da seqüência promotora tipo -24/-12.

A proteína RpoN de *H. seropedicae* apresenta um ponto isoelétrico calculado (5,25) superior ao das proteínas de *E. coli* (P24244), *K. pneumoniae* (P06223) e *S. typhimurium* (P26979) que foram 4,63, 4,60 e 4,63, respectivamente. Este resultado poderia ser devido a um diferente conteúdo de resíduos acídicos da região II, mas a proporção é semelhante entre as diferentes proteínas (dados não mostrados) (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIAN, 1997).

## 2. Construção e caracterização fisiológica do mutante *rpoN*

### 2.1. Mutagênese do gene *rpoN* de *H. seropedicae* por inserção de transposon

O Programa Genoma do Paraná (Genopar) seqüenciou completamente o genoma de *H. seropedicae*. Nos bancos de dados do projeto foi identificado um plasmídeo, designado Hs2400000012-C09, que contém o gene *rpoN* quase completo, com exceção dos primeiros 119 nucleotídeos da região 5'. Este clone foi recuperado e utilizado para mutagênese por inserção aleatória de transposon Tn5 que possui gene para resistência a tetraciclina (Material e Métodos item 13). Clones contendo a inserção do transposon no gene *rpoN* foram selecionados por análise de restrição. A digestão do plasmídeo Hs2400000012-C09 com *Pst*II gera quatro fragmentos: 3,4 Kb, que contém vetor

(pUC19) e parte do gene *rpoN*; 842 pb, que corresponde à região C-terminal do gene *rpoN*; 81 pb, correspondendo a região intergênica; e 653 pb, contém o gene que codifica para a proteína moduladora de  $\sigma^{54}$ . Assim, se o transposon fosse inserido no fragmento de 842 pb, haveria aumento do tamanho desta banda em 1,6 Kb referente ao tamanho do transposon, gerando um fragmento de 2,0 Kb, uma vez que é perdido 524 pb do fragmento de 842 pb devido a presença do sítio de restrição para enzima *PstI* no início do transposon (Figura 8).

Figura 8. Inserção do transposon EZ::TnTET-1 no gene *rpoN* de *H. seropedicae*

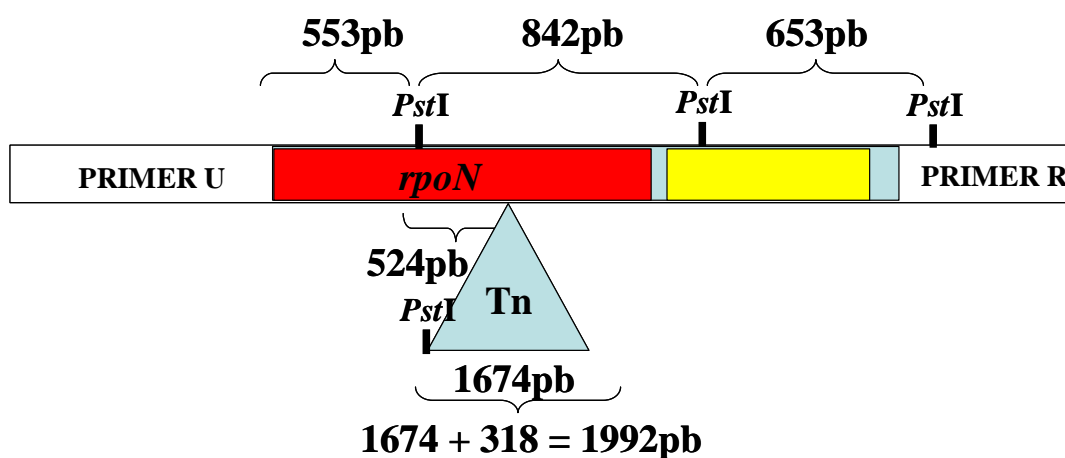


Fig. 8. O plasmídeo Hs2400000012-C09 contém o gene *rpoN* de *H. seropedicae*. Em branco está representado o vetor pUC19R, em vermelho parte do gene *rpoN* de *H. seropedicae*, em amarelo o gene que codifica para a proteína moduladora de  $\sigma^{54}$  e o triângulo azul representa o local de inserção do transposon EZ::TnTET-1 no gene *rpoN*. Os sítios de restrição para a enzima *PstI* estão demonstrados com os respectivos fragmentos gerados pela digestão enzimática.

Dessa forma, plasmídeos derivados do Hs2400000012-C09 contendo o transposon EZ::TnTET-1 e que apresentaram um perfil de restrição compatível, isto é, quatro bandas: uma de 1,9 Kb (transposon + 0,3 Kb do gene *rpoN* de *H. seropedicae*), uma de 542 pb (parte do gene *rpoN* de *H. seropedicae*), uma de 653 pb (gene que codifica para a proteína moduladora de  $\sigma^{54}$ ) e um de 4,2 Kb (vetor pUC19 + região 5' de *rpoN*), foram pré-selecionados para serem utilizados para mutagênese sítio dirigida da estirpe selvagem (SmR1) de *H. seropedicae*. Um plasmídeo com estas características, denominado pC09.8, foi selecionado e posteriormente seqüenciado para a determinação

exata do local de inserção do transposon. A inserção do transposon foi 1195 pb a jusante do sítio de início de tradução do gene *rpoN*.

A estirpe selvagem de *H. seropedicae* foi eletroporada com o plasmídeo pC09.8 e foram coletados 11 transconjugantes que cresceram em meio contendo o antibiótico tetraciclina. O DNA cromossomal destes transconjugantes foi purificado e digerido com a enzima *EcoRI*. Os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,7%) e transferidos para membrana de náilon para confirmação do local de inserção do transposon por hibridização (Figura 9). A sonda foi o plasmídeo pC09.8 digerido com *EcoRI*. Os perfis de restrição dos mutantes indicam inserção por simples recombinação (linhas 3 e 10 da figura 9) e dupla recombinação (linhas 4 a 9 e 11 da Figura 9) no genoma de *H. seropedicae* SmR1. Uma estirpe foi selecionada e denominada SmR13.17.

Figura 9. Análise por hibridização dos transconjugantes de *H. seropedicae* contendo inserção de transposon no gene *rpoN*

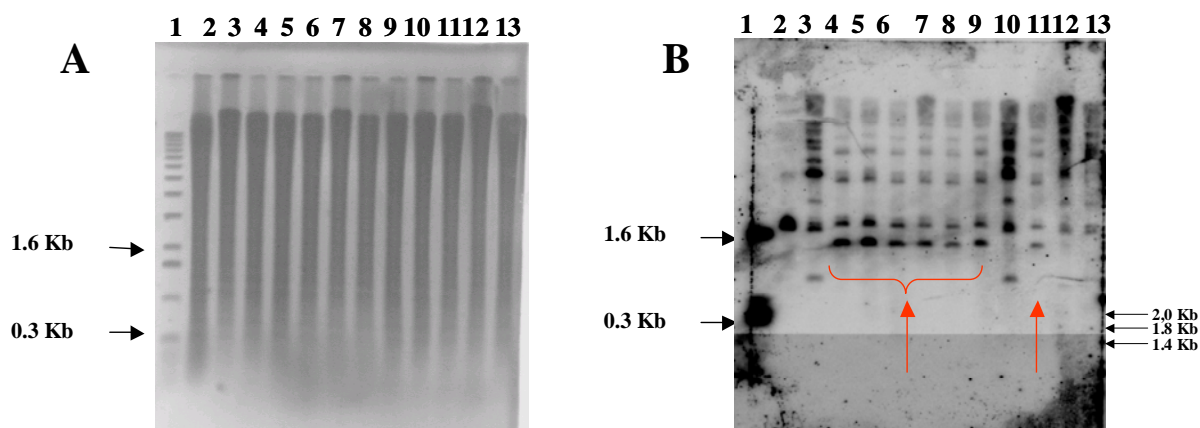


Fig. 9. Hibridização das estirpes transconjugantes de *H. seropedicae* contendo o transposon Tn5 inseridos no gene *rpoN*. **Painel A.** O DNA cromossomal dos mutantes foi purificado e digerido com *EcoRI*. Coluna 1: marcador de tamanho molecular; Coluna 2: DNA cromossomal da estirpe SmR1; Colunas 3 a 13: DNA cromossomal de diferentes transconjugantes digeridos com *EcoRI*. Os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TBE por 8 horas (40 V), à temperatura ambiente. **Painel B.** Posteriormente, os fragmentos de DNA foram transferidos para membranas de náilon e hibridizados com sonda homóloga (*rpoN* de *H. seropedicae*). As setas correspondem às estirpes que tiveram inserção do transposon Tn5 no gene *rpoN* de *H. seropedicae* por dupla recombinação.

O DNA cromossomal digerido com *EcoRI* geraria dois fragmentos de 1,8 Kb e 1,7 Kb. Os mutantes com inserção por dupla recombinação apresentam o fragmento de 1,8 Kb, mas o fragmento de 1,7 Kb desaparece e surgem três novas bandas, uma de 349 pb (parte do gene *rpoN*), de 2,0 Kb (transposon e parte do gene *rpoN*) e outra de 1,4 Kb (gene que codifica para a proteína moduladora de  $\sigma^{54}$ ) (Figura 10).

Figura 10. Representação esquemática de inserção de transposon EZ::TnTET-1 no gene *rpoN*

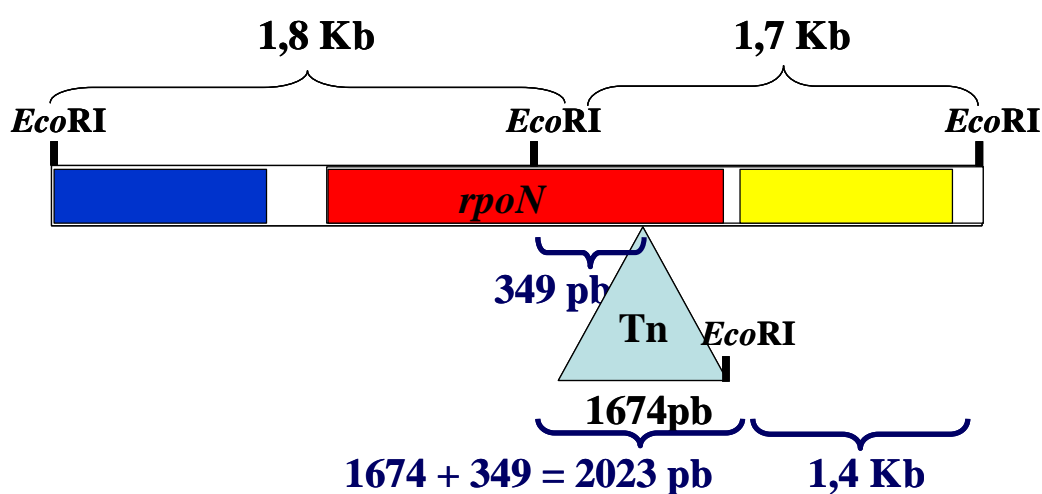


Fig. 10. Mapa físico da região do genoma de *H. seropedicae*. Em azul está representado região do genoma de *H. seropedicae* a montante do gene *rpoN*, em vermelho o gene *rpoN* e em amarelo o gene que codifica para a proteína moduladora de  $\sigma^{54}$ . O triângulo azul representa o local de inserção do transposon EZ::TnTET-1 no gene *rpoN*.

## 2.2. Análise fisiológica do mutante *rpoN* de *H. seropedicae*

O mutante *rpoN* (SmR13.17) foi inicialmente comparado com a estirpe selvagem SmR1 com relação a alguns fenótipos que poderiam ter sido afetados por esta mutação em *rpoN* (Tabela 7). Mutantes *rpoN* de organismos da classe das Proteobactérias são invariavelmente incapazes de fixar nitrogênio e de crescer em meio mínimo contendo nitrato como única fonte de nitrogênio (LEONARDO & GOLDBERG, 1980; TOUKDARIAN & KENNEDY, 1986; MILCAMPS et al., 1996; MICHIELS et al., 1998). Isto porque a maioria dos genes envolvidos na assimilação de

nitrogênio, incluindo os *nif* (fixação de nitrogênio), apresentam promotores *rpoN*-dependentes, incluindo os genes estruturais da nitrogenase (genes *nifHDK*) (Tabela 4).

Desta forma, para avaliar fisiologicamente a estirpe mutante *rpoN::EZTNtet* de *H. seropedicae* SmR13.17 foram testadas quanto a sua capacidade de crescer em meio NFbHP malato contendo 10 mmol/L de nitrato de potássio e sua atividade de nitrogenase. A estirpe mutante (SmR13.17) foi incapaz de crescer em meio mínimo contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, diferentemente do selvagem. A estirpe mutante também não apresentou atividade de nitrogenase (Tabela 7).

Tabela 7. Fenótipos das estirpes mutante e selvagem *rpoN* de *H. seropedicae*.

Condições	Estirpes	
	SmR1 (Selvagem)	SmR13.17 (mutante)
Crescimento em nitrato como fonte única de nitrogênio	+	-
Crescimento em aminoácidos como fonte única de nitrogênio	+	+
Crescimento em uréia como fonte única de nitrogênio	+	+
Crescimento em glucose como fonte única de carbono	+	+
Crescimento em citrato como fonte única de carbono	+	+
Crescimento em succinato como fonte única de carbono	+	+
Crescimento em malato como fonte única de carbono	+	+
Atividade de nitrogenase (nmol de etileno min <sup>-1</sup> mg de proteína <sup>-1</sup> )	12,0 (0,74)	0
Halo de crescimento em meio semi-sólido	+1,5 cm	+1,5 cm
Formação de película em meio semi-sólido	+	+

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em meio líquido, a absorbância (600 nm) das culturas foi ajustada para 0,5, e a cultura foi riscada em meio NFbHP malato sólido contendo 10 mmol/L de nitrato de sódio, 5 mmol/L de uréia ou 5 mmol/L de aminoácidos (glutamina, glutamato, arginina, leucina, histidina ou hidroxiprolina) como única fonte de nitrogênio. Para determinar da capacidade de utilização de fontes de carbono foi utilizado meio NFbHPN, mas como fontes únicas de carbono foram utilizados: 1% de glucose, 0,5% de succinato, 0,5% de citrato ou 0,5% de malato. As placas foram incubadas a 30°C por 14 horas. (+) representa crescimento e (-) ausência de crescimento. Para determinar a atividade de nitrogenase, as

estirpes selvagem e mutante de *H. seropedicae* foram inoculadas em meio NFbHP malato semi-sólido contendo 0,5 mmol/L de glutamato de sódio e as culturas incubadas a 30°C por 14 horas. Depois de formada a película de crescimento, os frascos foram fechados com rolha de borracha e injetados 0,5 mL de acetileno. Amostras de 0,5 mL da fase gasosa foram analisadas em cromatógrafo gás. O valor entre parênteses corresponde ao desvio padrão de três ensaios. Para os ensaios de motilidade as estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em meio líquido, as absorbâncias (600 nm) das culturas foram ajustadas para 0,5. Dez microlitros das culturas foram inoculadas em placas de NFbHP malato semi-sólido na ausência de fonte de nitrogênio ou na presença de 20 mmol/L de cloreto de amônio ou 0,5 mmol/L de glutamato de sódio para medida de halo de crescimento e 100 µL das culturas foram inoculadas em meio NFbHP malato semi-sólido na ausência de fonte de nitrogênio ou na presença de 20 mmol/L de cloreto de amônio ou 0,5 mmol/L de glutamato de sódio para avaliação da formação de película .

Por outro lado, a estirpe mutante foi capaz de crescer utilizando glucose, succinato, citrato ou malato como única fonte de carbono, da mesma forma que a estirpe selvagem. Este fenótipo foi diferente do descrito para estirpes mutantes *rpoN* de *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium japonicum*, mas foi similar ao encontrado para *Azospirillum brasilense* (RONSON et al., 1987a; KULLIK et al., 1991; MILCAMP et al., 1996). Assim, o mutante *rpoN* de *H. seropedicae* aparentemente não teve sua capacidade de utilização de ácidos carboxílicos afetada.

Ronson e colaboradores (1984; 1987a e 1987b) demonstraram que em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* a regulação do transporte de ácidos carboxílicos envolve interação entre dois produtos gênicos regulatórios específicos para o transporte de ácidos dicarboxílicos e o produto do gene *rpoN*. Os produtos dos genes *dctB* e *dctD* formam um sistema de dois componentes, que responde a presença de dicarboxilatos de 4 carbonos para regular a expressão do gene *dctA* que codifica uma proteína transportadora (JIANG, et al., 1989). Entretanto, a estirpe mutante *rpoN* de *H. seropedicae* não teve sua capacidade de utilização de ácidos dicarboxílicos afetada. Uma análise do banco de dados da seqüência genômica de *H. seropedicae* ([www.genopar.org](http://www.genopar.org)) revelou a presença dos genes *dctB*, *dctD* e *dctA*. A região a montante destes genes foi então analisada pelo programa PROMSCAN (<http://www.promscan.uklinux.net>), mas não foram encontradas seqüências similares a promotores dependentes de RpoN. Além disso, a procura na seqüência genômica de *H. seropedicae* revelou a presença de 8 sistemas que potencialmente podem captar dicarboxilatos (Tabela 8).

Como *H. seropedicae* é uma bactéria que apresenta motilidade e tem sido descrito que o fator  $\sigma^{54}$  é requerido para a biosíntese de flagelos em alguns microorganismos (KOHLENER et al., 1989; TOTTEN, LARA & LORY, 1990; MILCAMPES et al., 1996; JANAKIRAMAN & BRUN, 1997; JAGANNATHAN, CONSTANTINIDOU & PENN, 2001), foi testada a capacidade do mutante *rpoN* de formar halo de crescimento e película em meio semi-sólido (Tabela 7). O mutante *rpoN* não apresentou alteração de motilidade quando comparado a estirpe selvagem (SmR1). A mesma análise do banco de dados da seqüência genômica de *H. seropedicae* realizada para a procura dos genes que codificam para transportadores de ácidos carboxílicos foi realizada para genes envolvidos na formação de flagelos. *H. seropedicae* possui genes que codificam para proteínas flagelares distribuídos em três grupos, dois destes aparentemente são  $\sigma^{54}$ -dependentes (Tabela 8). A análise do terceiro grupo não foi possível devido à pequena região disponível para a procura da região promotora. Desta forma, não é possível afirmar que o gene *rpoN* de *H. seropedicae* não é requerido para a expressão dos genes envolvidos na síntese de flagelo.

### 2.3. Atividade de glutamina sintetase do mutante *rpoN* de *H. seropedicae*

A atividade biossintética da glutamina sintetase das estirpes mutantes *rpoN* e *ntrC* (DCP286A) de *H. seropedicae* foi a mesma da estirpe selvagem quando cultivada em altas concentrações de amônio. Em condições limitantes de amônio, as estirpes mutantes apresentaram aproximadamente 40% da atividade da estirpe selvagem (Figura 11).

Em diversas bactérias a amônia (ou íon amônio) é considerada como fonte preferida de nitrogênio por suportar crescimento rápido e sua presença previne a síntese de várias proteínas envolvidas no metabolismo de nitrogênio (REITZER & SCHNEIDER, 2001). A principal enzima bacteriana necessária para a captação de amônia em condições limitantes de nitrogênio fixado é a glutamina sintetase, uma proteína codificada pelo gene *glnA* (MAGASANIK, 1982; HUNT & MAGASANIK, 1985). Os níveis reduzidos da atividade de glutamina sintetase na estirpe mutante *rpoN* de *H. seropedicae* mostram que, como em várias espécies de bactérias, RpoN está envolvida na regulação expressão de *glnA* e, portanto, na assimilação de amônia. Como os genes regulatórios *ntrBC* estão no mesmo operon e são cotranscritos e co-regulados

com *glnA*, a proteína RpoN exerce uma função central na ativação do sistema Ntr de *H. seropedicae* sob condições limitantes de amônio.

Figura 11. Atividade biossintética da glutamina sintetase nas estirpes selvagem e mutantes *rpoN* e *ntrC* de *H. seropedicae*

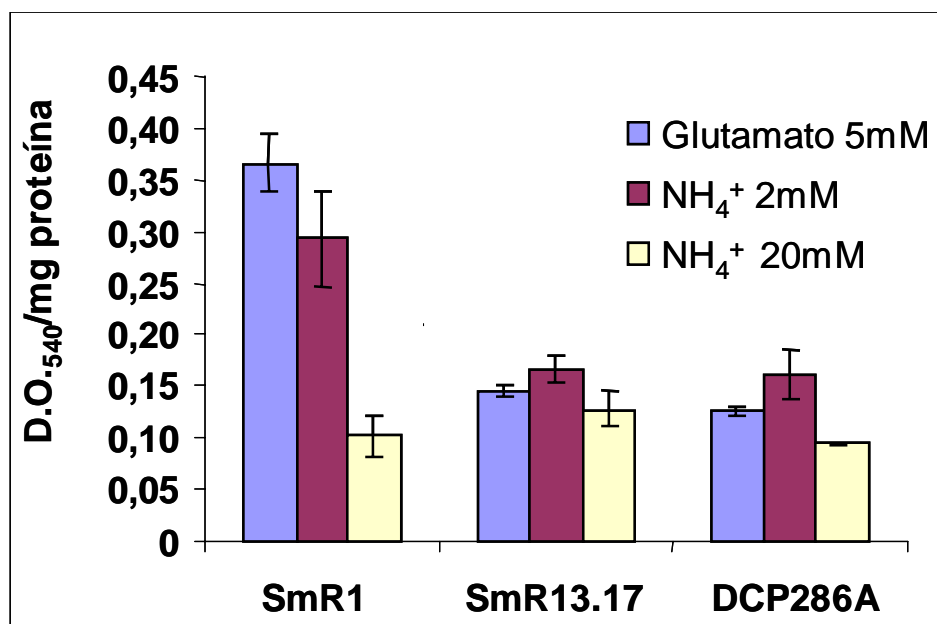


Fig.11. Atividade biossintética de glutamine sintetase (GS) das estirpes mutantes *ntrC* (DCP286A), *rpoN* (SmR13-17) e selvagem (SmR1) de *H. seropedicae* em condições de excesso e limitação de nitrogênio. As estirpes selvagem e mutante foram crescidas em meio NFbHP malato suplementado com 2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl (■), 20 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl (■) ou 5mmol/L de glutamato (■) at 30°C a 120 rpm. Os valores correspondem a media de três replicatas independentes. O desvio padrão está indicado como barras verticais.

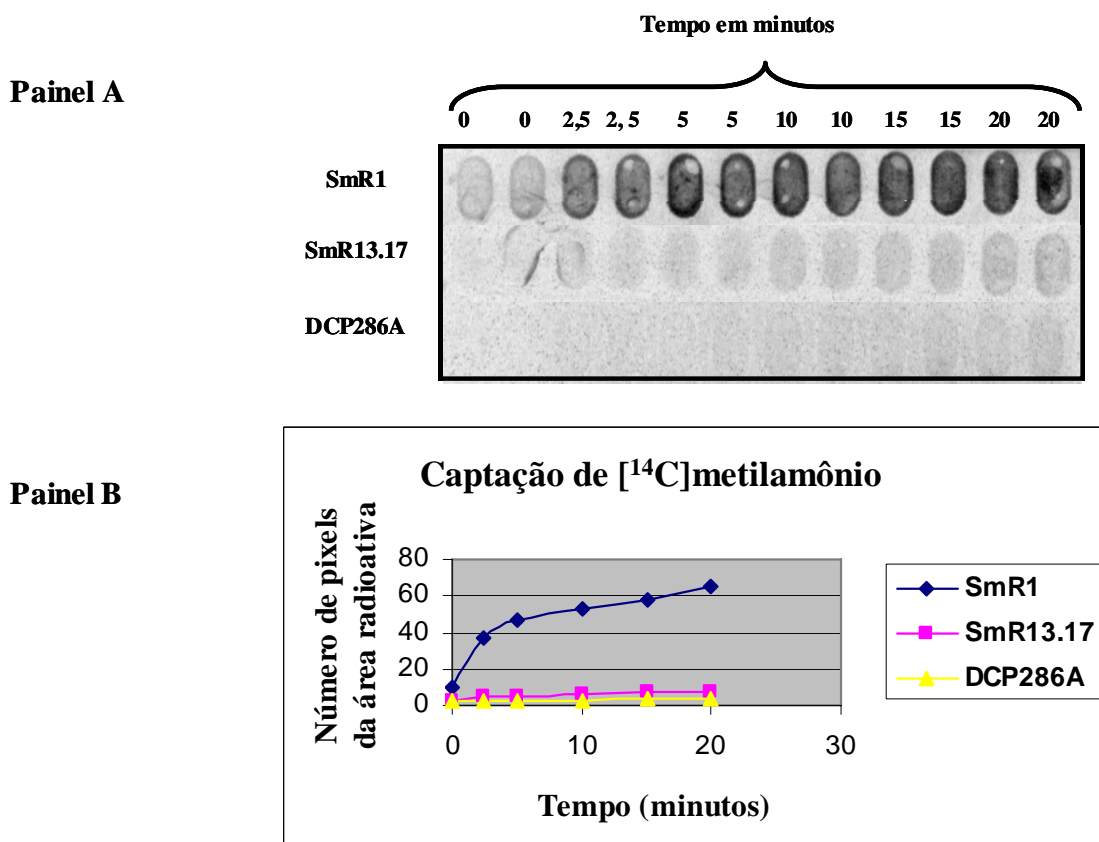
#### 2.4. Captação de [<sup>14</sup>C]metilamônio pelo mutante *rpoN* e *ntrC*

Para estudar o papel do gene *rpoN* no transporte de íons amônio em *H. seropedicae*, a captação de um análogo radioativo de amônio, o [<sup>14</sup>C]metilamônio, foi determinada nas estirpes *rpoN*, *ntrC* e selvagem de *H. seropedicae*.

A estirpe selvagem crescida em condições limitantes de amônio (2 mmol/L) foi capaz de captar [<sup>14</sup>C]metilamônio rapidamente, atingindo um máximo de captação em 10 minutos (Figura 12).



Figura 12. Captação de [ $^{14}\text{C}$ ]metilamônio pelas estirpes selvagem e mutantes *rpoN* e *ntrC* de *H. seropedicae* crescidas sob limitação de amônio



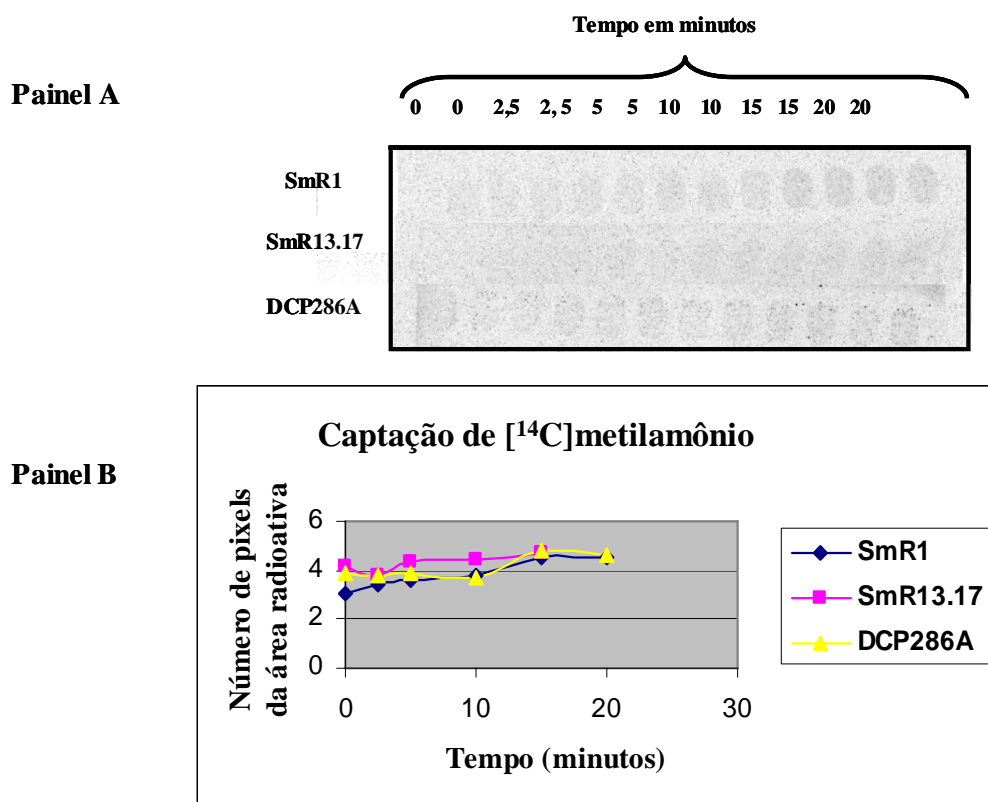
**Fig.12.** Captação de [ $^{14}\text{C}$ ]metilamônio. **Painel A.** As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas sob condições limitantes de amônio (2 mmol/L). O experimento foi realizado em duplicata e a quantidade de material radioativo incorporado foi determinada em PhosphorImager (Storm 820 GE HealthCare). Os números acima da figura indicam os períodos de incubação das células na presença de [ $^{14}\text{C}$ ]metilamônio. As estirpes foram: selvagem (SmR1) e as mutantes *rpoN* (SmR13.17) e *ntrC* (DCP286A). **Painel B.** Gráfico do volume da área radioativa versus tempo. Os resultados correspondem a um experimento representativo.

Em bactérias, o metilamônio é captado pelas proteínas transportadoras de amônio/amônia (HACKETTE et al., 1970; SIEWE et al., 1996). A proteína canal de amônia AmtB é a mais estudada e capaz de transportar também metilamônio. Após a captação, o metilamônio é conjugado ao glutamato formando  $\gamma$ -N-metilglutamina, em uma reação dependente de ATP e catalisada pela glutamina sintetase (BARNES, ZIMNIAK & JAYAKUMAR, 1983; SERVIN-GONZALEZ et al., 1987). A  $\gamma$ -N-metilglutamina não pode ser metabolizada e é tóxica. Assim, a captação

[<sup>14</sup>C]metilamônio ocorre rapidamente e procede até que a concentração de  $\gamma$ -N-metilglutamina atinja um valor máximo e é então paralisada. Os resultados obtidos são compatíveis com a presença de um transportador de amônio/amônia em células de *H. seropedicae* cultivadas sob condições limitantes de amônio.

Quando as células da estirpe selvagem foram crescidas sob condições de excesso de amônio não houve captação de metilamônio (Figura 13). Estes resultados confirmam que a proteína canal de amônia AmtB de *H. seropedicae* é expressa apenas em condições limitantes de nitrogênio fixado (NOINDORF et al., 2006).

Figura 13. Captação de [<sup>14</sup>C]metilamônio pelas estirpes mutantes *rpoN* e *ntnC* e selvagem de *H. seropedicae* cultivadas em excesso de íons amônio.



**Fig.13.** Captação de [<sup>14</sup>C]metilamônio. **Painel A.** As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas sob condições de excesso de amônio (20 mmol/L). O experimento foi realizado em duplicata e quantidade de material radioativo incorporado foi determinada em phosphorimager (Storm 820, GE HealthCare). Os números acima da figura indicam os períodos de incubação das células na presença de [<sup>14</sup>C]metilamônio. As estirpes foram: selvagem (SmR1) e as mutantes *rpoN* (SmR13.17) e *ntnC* (DCP286A). **Painel B.** Gráfico do volume da área radioativa versus tempo. Os resultados correspondem a um experimento representativo.

As estirpes mutantes *rpoN* e *nrC* de *H. seropedicae*, por outro lado, foram incapazes de transportar quantidades significativas de [<sup>14</sup>C]metilamônio quando foram crescidas sob condições limitantes ou excesso de amônio. Estes resultados indicam que as proteínas NtrC e RpoN são essenciais para a expressão de AmtB de *H. seropedicae*, como mostrado previamente por Noindorf e colaboradores (2006) utilizando fusões *amtB::lacZ*.

## 2.5. Análise “in silico” de promotores $\sigma^{54}$ -dependentes em *H. seropedicae*

Foram identificados na seqüência genômica de *H. seropedicae* do banco de dados do ProGama Genoma do Paraná (Genopar) alguns genes que são  $\sigma^{54}$ -dependentes em outras Proteobacteria (Tabela 4). Toda a seqüência intergênica a montante dos genes ou operons identificados foi então analisada quanto à presença de seqüências similares a promotor  $\sigma^{54}$ -dependentes utilizando o programa PROMSCAN. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 8.

Não foram encontradas seqüências similares a promotor dependente do fator sigma 54 a montante dos genes que codificam os prováveis transportadores de ácidos dicarboxílicos DctA2 e DctPQM2. Estes resultados estão de acordo com o fenótipo obtido para a estirpe mutante *rpoN* que foi capaz de crescer utilizando diferentes ácidos dicarboxílicos como fonte única de carbono (Tabela 7). A identificação de vários sistemas de transporte de dicarboxilatos pode ser explicada pela clara preferência de *H. seropedicae* por estes compostos (BALDANI et al, 1996). Além disso, a presença de vários sistemas de transporte de ácidos dicarboxílicos foi observada também em outras bactérias. Janausch e Kim (2001) observaram o transporte de ácidos dicarboxílicos (succinato) em mutantes quintuplos de *E. coli* (DctA, DcuA, DcuC, DcuD e CiT).

As nitrato redutases assimilatórias bacterianas podem ser divididas em três grupos baseados naqueles encontrados *Synechococcus* sp., *Bacillus subtilis* e *K. oxytoca*. *H. seropedicae* aparentemente apresenta um sistema misto, uma vez que apresenta o operon *nasFED* que codifica para o sistema de transporte de nitrato/nitrito em *K. oxytoca* e o operon *nasAnirBnirDnirBnarK* cujos produtos gênicos assemelham-se com as duas subunidades da nitrato redutase, com as duas da nitrito redutase e, adicionalmente, com uma proteína de transporte de nitrito/nitrato encontradas em *B. subtilis* (RICHARDSON et al., 2001). Este operon aparentemente é dependente de

RpoN, uma vez que foi encontrada uma sequência similar a protomor -24/-12 a montante.

Tabela 8. Identificação de genes de *H. seropedicae* que são dependentes do fator  $\sigma^{54}$  em outras Proteobacterias

Função	Genes em <i>H. seropedicae</i>	Tipo de promotor
Transporte de ácidos dicarboxílicos		
Contig: 246	- <i>dctA1</i>	nd
Contig: 248	- <i>dctA2</i>	$\sigma^{70}$ (70)
Contig: 241	- <i>kgtP</i>	$\sigma^{54}$ (89)
Contig: 245	- <i>dctPQM 1</i>	nd
Contig: 287	- <i>dctPQM2</i>	$\sigma^{70}$ (71)
Contig: 268	- <i>dctPQ-M1</i> (Fusão de Q e M)	$\sigma^{54}$ (87)
Contig: 255	- <i>dctPQ-M2</i> (Fusão de Q e M)	$\sigma^{54}$ (70)
Contig: 255	- Sistema TRAP não caracterizado	$\sigma^{54}$ (80)
Assimilação de nitrato		
Contig: 161	- <i>nasAnirBnirDnirBnarK</i>	$\sigma^{54}$ (97)
Contig: 196	- <i>nasFED</i>	$\sigma^{54}$ (74)
Contig: 203	- <i>nasR</i>	$\sigma^{54}$ (74)
Flagelo		
Contig: 277	- <i>fliAHs277.0138flhFflhAflhB</i>	$\sigma^{54}$ (71)
Contig: 277	- <i>flgBCDEFGHIJKL</i>	$\sigma^{54}$ (73)
Contig: 286	- <i>Hs286.1149flgEfliD</i>	nd

As seqüências a montante dos genes ou operons (aproximadamente 300 pb) foi obtida no banco de dados e submetida à análise de região promotora. nd a seqüência disponível a montante era muito curta, não permitindo a análise. Os números em parênteses representam o escore fornecido pelo programa PROSCAN. O promotor do gene *nifB*, que caracterizado por ensaio de transcrição “in vitro”, foi avaliado pelo programa PROSCAN com escore 90, e foi utilizado como controle positivo de promotor tipo  $\sigma^{54}$ . Não foi possível utilizar um controle positivo para o promotor tipo  $\sigma^{70}$  por não ter sido caracterizado ainda em *H. seropedicae*.

Em *K. oxytoca*, o grupo de genes *nasFEDCBA* também está sujeito ao controle de amônio e nitrato/nitrito. O primeiro é mediado pelo sistema Ntr (WU et al., 1999) e o segundo pela proteína anti-terminadora de transcrição NasR (WU et al., 1999; LIN & STEWART, 1996).

*H. seropedicae* possui genes que codificam para proteínas flagelares distribuídos em três grupos, dois destes aparentemente são  $\sigma^{54}$ -dependentes (Tabela 8).

### 3. Caracterização do promotor *nifB* de *H. seropedicae*

Os promotores *nif* de Proteobactérias são tipicamente dependentes do fator  $\sigma^{54}$  (introdução item 2.2.6). Esta região promotora apresenta um sítio de ligação para a proteína IHF, dois sítios para ligação de NifA, além da seqüência promotora -24/-12. Inicialmente, a função destas seqüências foram caracterizadas *in vitro* utilizando as proteínas RpoN de *K. pneumoniae* e IHF de *E. coli*. A expressão dependente de IHF também foi caracterizada *in vivo* utilizando estirpe de *E. coli ihf*. A capacidade de ligação da proteína NifA de *K. pneumoniae* ao promotor *nifB* foi caracterizada anteriormente (REGO et al., 2006). Portanto, a atividade da proteína RpoN de *H. seropedicae* foi caracterizada utilizando o promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae* e comparada com a da proteína RpoN de *K. pneumoniae*.

#### 3.1. Função de IHF na transcrição do promotor *nifB*

O promotor *nifB* de *H. seropedicae* contém a seqüência consenso do sítio de ligação de IHF iniciando na posição - 37 do início de transcrição (posição 208 a 220 Figura 14). Para determinar a funcionalidade desta seqüência, uma fusão *nifB::lacZ* (pEMS140) foi introduzida em estirpes de *E. coli* N99 (IHF<sup>+</sup>), NH678 (*himA42*, IHF<sup>-</sup>). Na presença de NifA, a expressão de *nifB* na estirpe N99 (IHF<sup>+</sup>) foi 10 vezes maior do que na estirpe mutante IHF<sup>-</sup> (Tabela 9). Este resultado indica que IHF é um efector positivo da expressão de *nifB* de *H. seropedicae*.

Figura 14. Região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*

```

CGCGCCAGCCGGTTGTATTGATGGATTCCCCGGCTCGGCACGTCCTCGCATTCTCCTTCT
      10          20          30          40          50          60

CCTTCTCCACTGCGTCAGGCTCATTGCGGCGCGCTCAATTGCAGGCGCCGGCCCGTGCTG
      70          80          90          100         110         120

CATTGTTCGTGTTCATGACAAGCGCCACCCACAATGTATCGCCGATTGTTCGCTATCCTCAC
      130         140         150         160         170         180

ATCGCCGTACGACGCAATTCTCCGCTATGTCCATTGAATTGATTGATTATTTTGTCTGGCA
      190         200         210         220         230         240

CGTTTTGGCTATGTCCTCAGGAGAAGGCCAGGCATCACTTTCCTGAAAGGGACTATCC
      250         260         270         280         290         300

      M Q P T Q Y V G I Q D I K S L G T L
ATGCAGCCACACAATACGTCGGTATCCAGGACATCAAATCGCTAGGCACCTTGCTGGAC
      310         320         330         340         350         360

```

Fig. 14. Região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*. Os dois sítios de ligação para a proteína NifA (posição 124 a 139 e posição 166 a 181) estão sublinhados. A sequência promotora -24/-12 (posição 236 a 251) está sublinhada e marcada em negrito, o provável sítio de ligação ao ribossoma (posição 290 a 294) está marcado em negrito. O provável sítio de ligação de IHF (posição 212 a 224) está sublinhado e em itálico. A sequência de oligonucleotídeos iniciadores p11 (posição 15 a 34) e p12 (posição 341 a 359) está em itálico e em negrito.

Tabela 9. A expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae* é estimulada por IHF

Estirpe	Plasmídio	Atividade de $\beta$ -galactosidase (Unidade Miller)	
		NH <sub>4</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
N99	-	260 (60)	139 (80)
N99	pEMS140	177 (50)	180 (54)
N99	pEMS140/pMC71A	1746 (367)	2130 (314)
NH678	-	43 (16)	31 (13)
NH678	pEMS140	41 (22)	31 (19)
NH678	pEMS140/pMC71A	93 (5)	56 (10)

As culturas foram crescidas na presença ou ausência de NH<sub>4</sub>Cl. NH<sub>4</sub><sup>-</sup>: ausência de íons amônio e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 20 mmol/L cloreto de amônio. Estirpes de *E. coli*: N99 (IHF<sup>+</sup>) e HN678 (IHF<sup>-</sup>). Plasmídeos: pEMS140 (*nifB*::*lacZ*) e pMC71A (proteína NifA de *K. pneumoniae* expressa constitutivamente). Os resultados correspondem à média de pelo menos 3 experimentos independentes e os números em parênteses correspondem ao desvio padrão.

Devido ao fato do sítio de ligação para IHF na região promotora do gene *nifB* apresentar alto grau de conservação com o da seqüência consenso para o sítio de ligação para IHF (5'-WATCAANNNTTR-3'), a capacidade de IHF ligar-se ao promotor foi testada *in vitro* (YANG & NASH, 1989). Concentrações crescentes de IHF de *E. coli* produziram maior quantidade do complexo DNA-proteína de menor mobilidade eletroforética (Figura 15), indicando a ligação de IHF ao promotor *nifB* de *H. seropedicae*.

Figura 15. Ligação da proteína IHF a região promotora do gene *nifB*

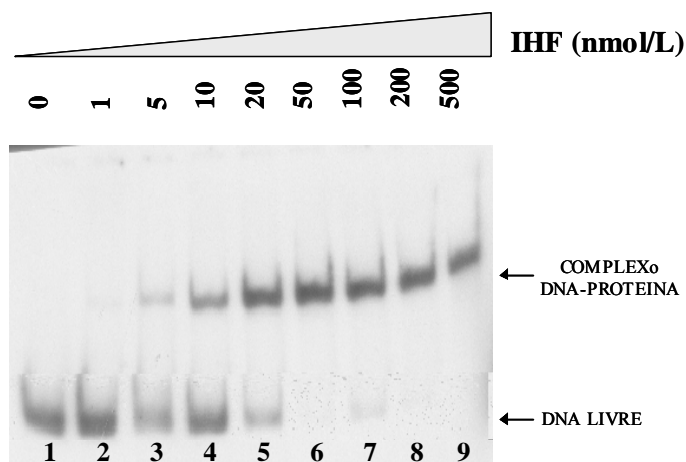


Fig. 15. Ligação de IHF a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*. Concentrações crescentes (0 a 500 nmol/L) da proteína IHF de *E. coli* foram incubadas com o fragmento de 345 bp contendo o promotor *nifB* marcado com [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP conforme descrito em Materiais e Métodos (item 20). Linhas: 1- fragmento contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, linhas 2 – 9 promotor *nifB* com concentrações crescentes da proteína IHF.

A proximidade do sítio de ligação da proteína IHF e da seqüência promotora -24/-12 nos levou a investigar a extensão da região ocupada por IHF quando ligado a seu sítio em ensaios de *footprinting in vitro* com DNase I. Este experimento permitiu determinar uma que a área protegida por IHF se estende da posição 196 até 232 (Figuras 14 e 16)



Figura 16. Região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* é protegida pela ligação a IHF

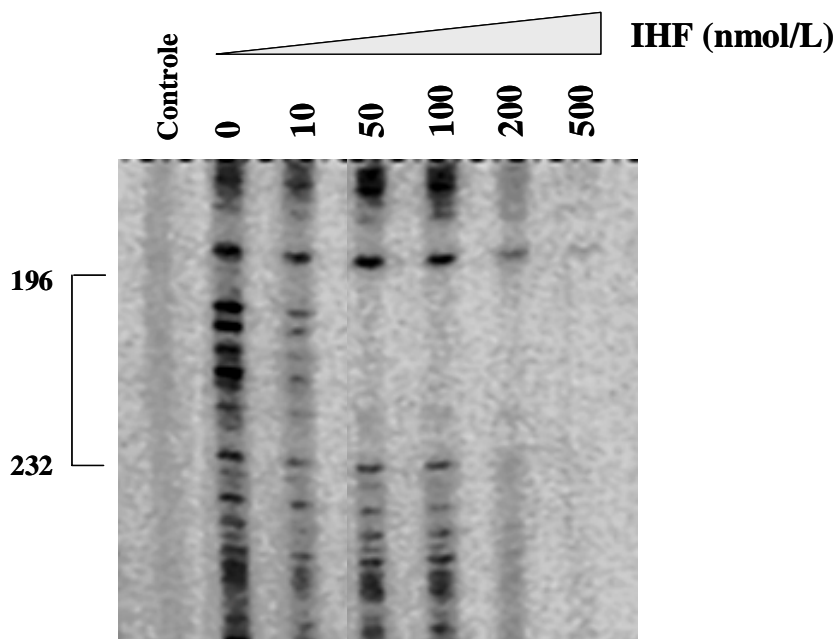


Fig. 16. Foi utilizado um fragmento linear de 345 bp contendo toda a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* marcado com [ $^{32}$ P]. A proteína IHF foi adicionada às amostras nas concentrações indicadas na figura. Reações de seqüenciamento com o oligonucleotídeo iniciador p11 marcado com [ $^{32}$ P] foram utilizados como referência. A área protegida pela proteína IHF compreende os nucleotídeos 196 a 232 demonstrados na sequencia da figura 14.

Para determinar a funcionalidade das seqüências regulatórias do promotor foi realizado ensaio de transcrição *in vitro*. Neste ensaio a proteína IHF (5 nmol/L) foi adicionada ao fragmento de DNA contendo a região promotora e subseqüentemente foi adicionada a holoenzima  $\sigma^{54}$  de *K. pneumoniae*-RNA polimerase (40 nmol/L de RNAP e 120 nmol/L de  $\sigma^{54}$ ), a proteína ativadora NifA (750 nmol /L) e GTP para permitir a formação de complexo aberto. Ao final da reação foi adicionado heparina ao sistema e os demais nucleotídeos foram adicionados para permitir a formação de transcritos completos a partir dos complexos heparina-resistentes ou iniciados. A Figura 17 mostra que IHF aumenta a produção de transcritos do promotor *nifB* em 4 a 6 vezes.

Figura 17. Efeito de IHF sobre a transcrição do promotor *nifB* *in vitro*

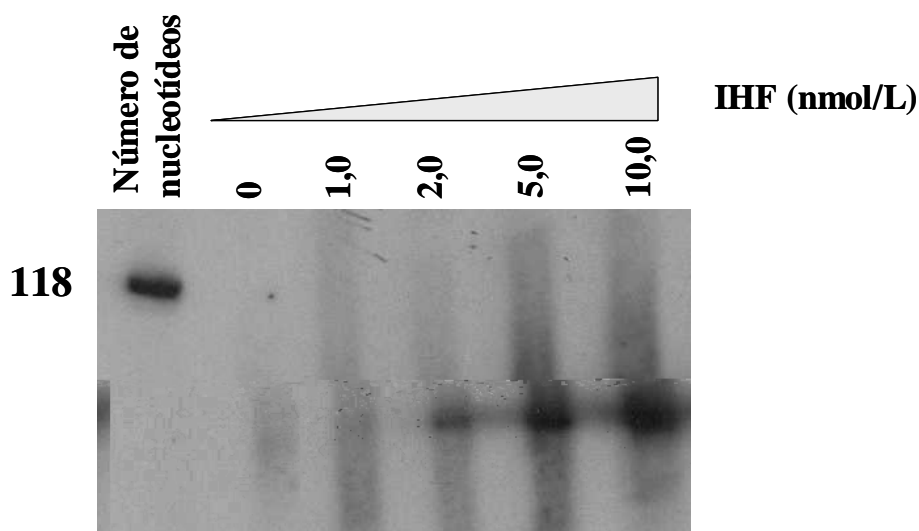


Fig. 17. As reações continham 10 nmol/L de um fragmento linear compreendendo a região promotora do gene *nifB*, 40 nmol/L de RNAP, 120 nmol/L de  $\sigma^{54}$ , 750 nmol/L da proteína NifA e concentrações crescentes de IHF (0, 1,0, 2,0, 5,0 e 10,0 nmol/L).

Para investigar o efeito de IHF sobre a ligação da holoenzima  $\sigma^{54}$ -RNA polimerase ao promotor *nifB*, foi utilizada a proteína RpoN de *K. pneumoniae* e a enzima núcleo da RNA polimerase de *E. coli* para formar a RNA polimerase holoenzima. Na presença de IHF foram suficientes concentrações menores de holoenzima KpRpoN-RNAP para a complexação de todo o DNA (Figura 18), sugerindo que IHF estimula o recrutamento de RNA polimerase ao promotor. Este resultado surpreende, uma vez que IHF poderia, por impedimento espacial, atrapalhar a ligação da holoenzima ao DNA. Além disso, o sítio de ligação de IHF está localizado na face oposta da região conservada -24/-12 e do sítio de ligação para a proteína ativadora NifA. Esta disposição sugere que IHF modifica a conformação do promotor na face oposta facilitando a ligação da holoenzima (HALES, GUMPORT & GARDNER, 1994).

Figura 18. Efeito de IHF sobre a ligação da holoenzima ao promotor *nifB*

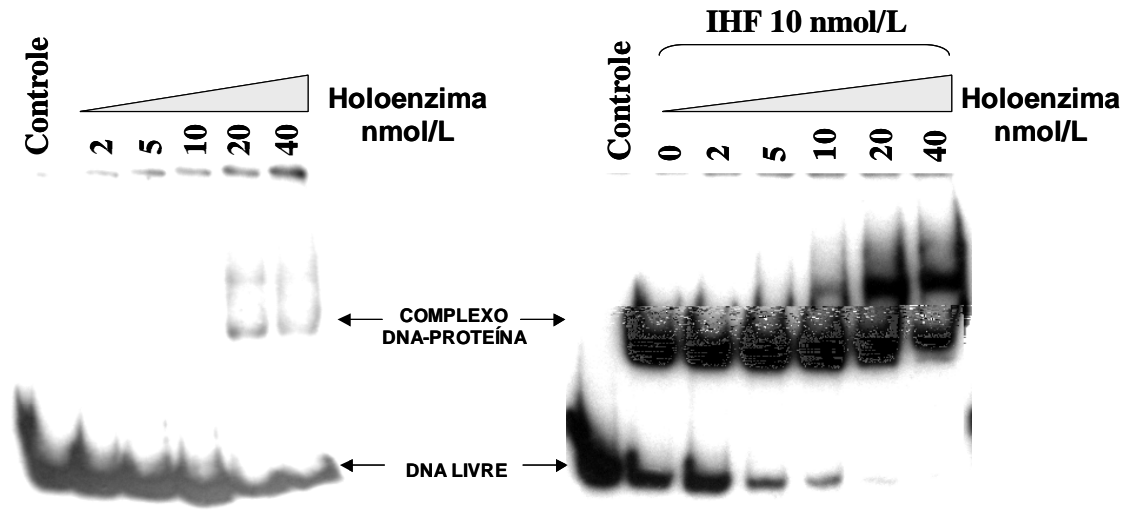


Fig. 18. Ligação da holoenzima KpRpoN-RNAP ao promotor *nifB* de *H. seropedicae* na presença e na ausência de IHF. Concentrações crescentes de holoenzima foram incubadas com fragmento de DNA de 265 pb contendo o promotor *nifB* marcado com [<sup>32</sup>P].

#### 4. Purificação e caracterização da atividade da proteína RpoN de *H. seropedicae*

##### 4.1. Clonagem do gene *rpoN* de *H. seropedicae* em vetor de expressão

Oligonucleotídeos iniciadores complementares às regiões N-terminal (5' CCAGAAAGACATATGAAACAG 3') e C-terminal (5' TCAGCGGGATCCTTGCC 3') do gene *rpoN* de *H. seropedicae*, que continham os sítios de enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, respectivamente, foram utilizados em reações de PCR, nas quais foi utilizado como molde o DNA cromossomal de *H. seropedicae*. Fragmentos de DNA de diversos tamanhos foram obtidos como produto de amplificação (Figura 19). Entre estes, o produto de aproximadamente 1,4 Kb (tamanho correspondente ao gene *rpoN* de *H. seropedicae*) foi purificado por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão e clonado no vetor pTZ18R, produzindo o plasmídeo pTZRPON. O inserto deste plasmídeo foi sequenciado para confirmar a identidade do gene *rpoN* e, então,

transferido para o vetor pET28a como um fragmento *NdeI-BamHI*, produzindo o plasmídeo pET28aRPON. Este plasmídeo expressa a proteína RpoN com uma cauda de 6 histidinas ligada a sua extremidade N-terminal (RpoN-His).

Figura 19. Perfil eletroforético do produto de PCR para obtenção do gene *rpoN* de *H. seropedicae*

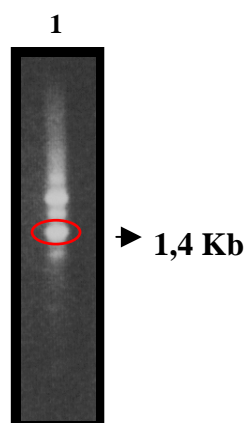
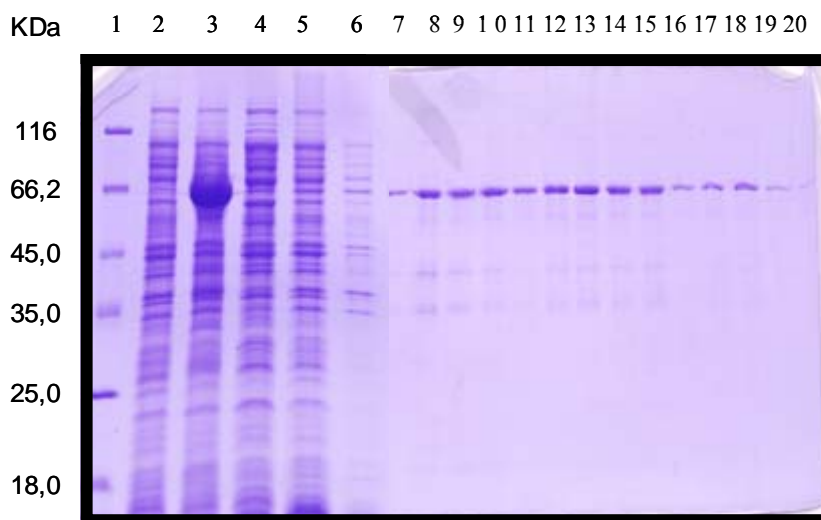


Fig. 19. Eletroforese do produto de amplificação por PCR a partir de DNA cromossomal de *H. seropedicae* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores. Linha 1: produto de PCR. Os fragmentos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão na concentração de 0,7%, em tampão TAE, por 7 horas a 20 V, à temperatura ambiente. Posteriormente, a banda de DNA correspondente a aproximadamente 1,4 Kb foi recortada e purificada.

#### 4.2. Purificação da proteína RpoN de *H. seropedicae*

A proteína RpoN de *H. seropedicae* foi superexpressa em *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET28aRPON. A Figura 20 mostra o eletroforetograma em SDS-PAGE das proteínas totais desta estirpe antes e após indução com IPTG. Uma banda de massa molecular aproximada de 62 kDa, correspondente a RpoN-His, pode ser visualizada após indução. A amostra (5 mL) contendo 16 mg de proteína foi aplicada em coluna de HiTrap Chelating HP. As frações obtidas foram coletadas e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE. Após esta etapa de purificação foram obtidas duas frações de proteínas, uma com maior grau de pureza que a outra, contendo 550  $\mu$ g e 1,4 mg de proteína total, respectivamente.

Figura 20. Eletroforetograma de proteínas em gel de SDS-PAGE dos extratos livres de células da estirpe de *E. coli* expressando a proteína RpoN-His de *H. seropedicae*.



1. Marcador de massa molecular
2. Extrato livre de células de BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS (pET28aRPON).
3. Extrato livre de células de BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS (pET28aRPON) induzido com IPTG
4. Extrato livre de células de BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS (pET28a)
5. Extrato livre de células de BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysS (pET28a) induzido com IPTG
6. Precipitado após lise celular
- 7 - 20. Frações do eluato da coluna de HiTrap Chelating HP

Eletroforetograma de proteínas em gel de SDS-PAGE das frações eluídas da coluna HiTrap Chelating HP durante a purificação da proteína RpoN-His. Aliquotas (10 $\mu$ L) das frações obtidas durante cada etapa de purificação da proteína RpoN-His foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE (10%) e as proteínas foram coradas com coomassie blue.

Algumas proteínas têm mobilidade eletroforética anormal nos sistemas Tris-glicina/dodecil-sulfato de sódio (SDS). Estas anomalias em geral são dependentes da composição de aminoácidos das proteínas. RpoN é uma proteína ácida e possui a mobilidade correspondente a uma proteína com massa molecular superior a 54 KDa, como já reportado na literatura (LOWE, HAGER & BURGESS, 1979; HUNT & MAGASANIK, 1985). Estes autores reportaram taxa de migração correspondente à massa molecular para RpoN de *E. coli* variando de 75 a 82 KDa. A massa molecular

aparente de RpoN-His de *H. seropedicae* determinada por eletroforese SDS-PAGE foi de aproximadamente 62 KDa, sugerindo que esta proteína também possuía migração anormal neste sistema eletroforético.

#### 4.3. Ensaio de Retardamento em Gel do Complexo Promotor *nifB*-proteína RpoN-His

Ao contrário de  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{54}$  é capaz de se ligar a suas seqüências de ligação na ausência de RNAP (BUCK & CANNON, 1992). A proteína RpoN-His de *H. seropedicae* purificada foi capaz de se ligar à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*. A Figura 21 mostra que quando a concentração de RpoN aumenta de 1,0  $\mu\text{mol/L}$  a 8,0  $\mu\text{mol/L}$  a intensidade da banda do complexo RpoN -DNA também aumenta. A proteína RpoN-His de *K. pneumoniae* (REGO et al., 2006) também foi capaz de se ligar a este promotor em concentrações semelhantes, sugerindo a semelhança funcional entre as proteínas dos dois organismos.

FIGURA 21. Efeito da concentração da proteína RpoN na formação do complexo promotor *nifB*-RpoN-His

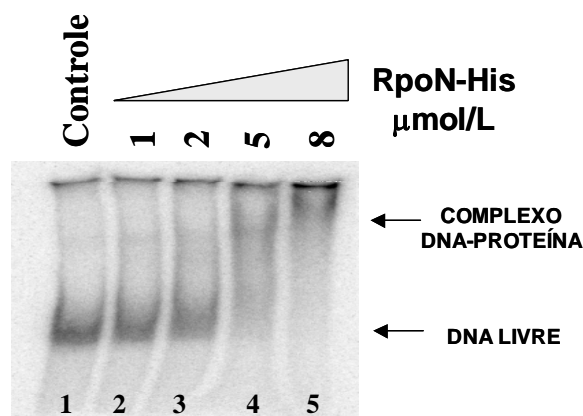


Fig. 21. Concentrações crescentes de proteína RpoN-His purificada de *H. seropedicae* foram incubadas com um fragmento de 368 pb contendo o promotor do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP na presença de 3,2 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA de timo. Linha: 1. fragmento de 368 pb contendo o promotor do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP; Linha 2: fragmento de 368 pb contendo o promotor do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP e 1  $\mu\text{mol/L}$  de proteína RpoN-His; Linha 3: fragmento de 368 pb contendo o promotor do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP e 2  $\mu\text{mol/L}$  de proteína RpoN-His; Linha 4. fragmento de 368 pb contendo o promotor do gene *nifB* marcado

com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP e 5  $\mu\text{mol/L}$  de proteína RpoN-His, e Linha 5: fragmento de 368 pb contendo o promotor do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP e 8  $\mu\text{mol/L}$  de proteína RpoN-His.

A afinidade da proteína a RpoN-His purificada pela região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi aumentada na presença do núcleo da RNA polimerase de *E. coli* (Figura 22).

FIGURA 22. Efeito da concentração da proteína RNA polimerase na formação do complexo promotor *nifB*-RpoN-His de *H. seropedicae*

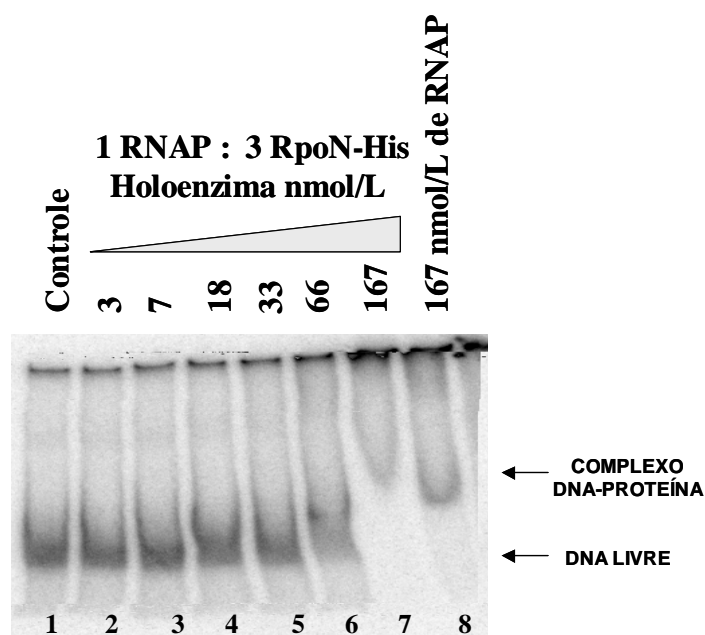


Fig. 22. Concentrações crescentes da holoenzima RNAPolimerase/RpoN-His (1 RNA polimerase de *E. coli*:3 RpoN de *H. seropedicae*) foram incubadas com o fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP na presença de 3,2 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA de timo. Linha 1. fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP; linhas 2 - 7: fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP com 3, 7, 18, 33, 66 e 167 nmol/L de holoenzima RNAPolimerase/RpoN-His, respectivamente; linha 8: fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP com 167 nmol/L de RNA polimerase de *E. coli*.

Este resultado indica que a proteína RpoN-His de *H. seropedicae* se liga de forma específica a RNAPolimerase de *E. coli*. Esta interação aumenta sensivelmente sua afinidade pela região promotora do gene *nifB*, uma vez que a formação de complexo proteína-DNA observada com aproximadamente 33 nmol/L de holoenzima RNAPolimerase/RpoN-His (99 nmol/L de RpoN-His), e 167 nmol/L de holoenzima (500 nmol/L RpoN-His) ligou todas as moléculas disponíveis do promotor *nifB* de *H. seropedicae*. A interação da enzima núcleo (167 nmol/L) com o promotor *nifB* também foi observada, mas a taxa de migração foi diferente daquela na presença de RpoN-His confirmando que a enzima núcleo de *E. coli* e RpoN-His de *H. seropedicae* ligam-se simultaneamente ao promotor *nifB*. Da mesma forma que observado para RpoN de *K. pneumoniae*, IHF aumenta a afinidade da holoenzima contendo a proteína RpoN-His de *H. seropedicae* (Figura 23).

FIGURA 23. Efeito da concentração da proteína IHF na formação do complexo Holoenzima RNA polimerase-RpoN-His-promotor *nifB* de *H. seropedicae*

Concentrações crescentes da holoenzima RNA polimerase-RpoN-His (1 RNA polimerase de *E. coli* :3 RpoN-His de *H. seropedicae*) foram incubadas com o fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP na presença ou ausência de IHF e na presença de 3,2 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA de tимо. Linha: 1. fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP; Linhas 2: fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP e 5 nmol/L de IHF; Linhas 3 a 6:



fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP e 20, 50, 100 e 200 nmol/L de holoenzima RNA polimerase-<sup>54</sup> respectivamente; Lanes 7 – 10: fragmento de 368 pb contendo a região promotora do gene *nifB* marcado com [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, 5 nmol/L de IHF e 20, 50, 100 e 200 nmol/L de holoenzima RNA polimerase-RpoN-His respectivamente.

### Considerações Finais

Na região do genoma de *H. seropedicae* onde se localiza o gene *rpoN* foram encontradas 6 ORFs (*open reading frame*) potencialmente co-transcritas com *rpoN* e cujos produtos gênicos são altamente conservados em outros organismos. Estas ORFs são homólogas a genes que tem sido encontrados adjacentes ao *rpoN* em diversos outros organismos como *Shewanella oneidensis*, *Photobacterium profundum*, *Vibrio cholerae*, *Photorhabdus luminescens*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas putida* (Figura 5). Em alguns organismos tais como *K. pneumoniae* e *P. putida* os genes *ptsN* e *ptsH* estão presentes no operon *rpoN*, que aparentemente estão envolvidos no controle de alguns promotores RpoN-dependentes (MERRICK & COPPARD, 1989; KULLIK et al, 1991; EARTH, ORNSTON & HILLEN, 1994; FLEISCHMANN et al, 1995; POWELL et al., 1995; JANAKIRAMAN & BRUN, 1997; MICHIELS et al., 1998). Estes genes não foram identificados em *H. seropedicae*: a jusante do gene *rpoN* está localizada uma ORF altamente conservada que pode exercer um efeito regulador sobre promotores RpoN-dependentes (MERRICK, GIBBINS & TOUKDARIAN, 1987; RONSON et al., 1987a; INOUE et al, 1989; MERRICK & COPPARD, 1989).

A estirpe mutante não apresentou atividade de nitrogenase, não foi capaz de crescer em meio mínimo contendo nitrato como fonte única de carbono, apresentou baixa atividade de glutamina sintetase sob condições limitantes de amônio, e redução drástica da captação de metilamônio. Estes resultados confirmaram o envolvimento do gene *rpoN* na regulação dos processos de assimilação de nitrogênio em *H. seropedicae*, como já descrito para várias espécies bacterianas. As medidas da captação de [ $^{14}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> indicam que o gene *ntnC* de *H. seropedicae* é necessário para o transporte de amônio. Por outro lado, a capacidade de utilização de dicarboxilatos como fonte única de carbono não foi afetada pela mutação do gene *rpoN*.

Até o momento os resultados sugerem que atuação do fator sigma 54 da RNAPolimerase de *H. seropedicae* está restrita ao metabolismo de compostos nitrogenados. Entretanto análise *in silico* revelou prováveis promotores dependentes de *rpoN* a montante de 3 grupos de genes provavelmente envolvidos na captação de ácidos dicarboxílicos e de genes envolvidos na síntese de flagelos, sugerindo que a proteína RpoN pode ser necessária para a ativação de expressão de um conjunto específico de transportadores de carboxilatos e para síntese de flagelos.

Os fatores sigma possuem no mínimo duas atividades: (1) Reconhecimento e ligação ao DNA, e (2) interação com RNA polimerase. Para analisar a atividade da proteína RpoN de *H. seropedicae*, foi determinada sua capacidade de ligação *in vitro* ao promotor *nifB* de *H. seropedicae* e de interagir com RNAPolimerase de *E. coli*. Foi observado que a RpoN de *H. seropedicae* é capaz de se ligar de forma específica a um promotor RpoN-dependente, mas com baixa afinidade, que é aumentada na presença das proteínas RNA polimerase e IHF.

## CONCLUSÕES

Inativação insertional do gene *rpoN* de *H. seropedicae* produziu um efeito pleiotrópico. A estirpe mutante não foi capaz de utilizar nitrato ou dinitrogênio como fontes de nitrogênio, perdeu a capacidade de captação metilamônio e apresentou redução de 50% na atividade de glutamina sintetase quando cultivada em baixas concentrações de nitrogênio.

A proteína RpoN-His de *H. seropedicae* apresentou atividade típica de fator sigma 54 da RNAPolimerase: foi capaz de se ligar ao promotor -24/-12 do gene *nifB* com baixa afinidade; a afinidade pelo promotor aumentou na presença do núcleo da RNAPolimerase de *E. coli*. A proteína RpoN de *Klebsiella pneumoniae* apresentou comportamento semelhante.

A proteína IHF liga-se a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*

A proteína IHF estimula a ativação por NifA do promotor *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* *in vivo* e *in vitro*

A proteína IHF estimula a ligação de RNAPolimerase bacteriana associada ao fator  $\sigma^{54}$  de *K. pneumoniae* e de *H. seropedicae* à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON, N. H. & KOOMEY, M. Molecular cloning and characterization of a proline iminopeptidase gene from *Neisseria gonorrhoeae*. **Mol. Microbiol.**, v. 9, p. 1203-1211, 1993.

ARCONDEGUY, T., JACK, R. & MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001

ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A. & ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, v. 178, p.4830-4838, 1996.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A. & ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P(II): effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 339-343, 1999.

AUSTIN, S.; HENDERSON, N. & DIXON, R. Requirements for transcriptional activation in vitro of the nitrogen-regulated *glnA* and *nifLA* promoters from *Klebsiella pneumoniae*: dependence on activator concentration. **Mol. Microbiol.**, v. 1, 92-100, 1987.

AUSUBEL, F. M. Regulation of nitrogen fixation genes. **Cell**, v.37, p. 5-6, 1984.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A. & STRUHL, K. 1999. **Short protocols in molecular biology**. 4ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Effect of the inoculation of *Azospirillum* spp. On the nitrogen assimilation of field grown wheat. **Plant and Soil**, v. 95. p. 109-121, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Inoculation of field grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. In Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4. p. 37-40, 1987.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHOFF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum*

*rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of a clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, p. 549-579, 2005.

BAR-NAHUM, G. & NUDLER, E. Isolation and characterization of  $\sigma^{70}$ -retaining transcription elongation complexes from *Escherichia coli*. **Cell**, v. 106, p. 443-451, 2001.

BARNES, E. M. Jr.; ZIMNIAK, P. & JAYAKUMAR, A. Role of glutamine synthetase in the uptake and metabolism of methylammonium by *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 156, p. 752-757, 1983.

BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B. & MORETT, E. Compilation and analysis of  $\sigma^{54}$ -dependent promoter sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, p. 4305-4313, 1999.

BELITSKY, B. R. & SONENSHEIN, A. L. An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 96, p. 10290-10295, 1999.

BENDER, R. A.; JANSSEN, K. A.; RESNICK, A. D.; BLUMENBERG, M.; FOOR, F. & MAGASANIK, B. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. **J. Bacteriol.**, v. 129, p. 1001-1009, 1977.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M. & PEDROSA, F. O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **Europ. J. Biochem.**, v. 269, p. 3296-3303, 2002.

BENNETT, L. T.; CANNON, F. & DEAN, D. R. Nucleotide sequence and mutagenesis of the *nifA* gene from *Azotobacter vinelandii*. **Mol. Microbiol.**, v. 2, p. 315-321, 1988.

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDENO-TARRAGA, A. M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, Y. T.; HOWARTH, S.; HUANG, C. H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. & HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, p. 141-147, 2002.

BERGHOFER-HOCHHEIMER, Y.; LU, C. Z. & GROSS, C. A. Altering the interaction between sigma70 and RNA polymerase generates complexes with distinct transcription-elongation properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 102, p. 1157-1162, 2005.

BERTONI, G.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. & de LORENZO, V. Active recruitment of sigma54-RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and alphaCTD. **EMBO J.**, v. 17, p. 5120-5128, 1998.

BIRKMANN, A.; SAWERS, R. G. & BOCK, A. Involvement of the *ntrA* gene product in the anaerobic metabolism of *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 210, p. 535-542, 1987.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G. 3rd, BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B. & SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453-1474, 1997.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, p 195-209, 1995.

BONDARENKO, V.; LIU, Y.; NINFA, A. & STUDITSKY, V. M. Action of prokaryotic enhancer over a distance does not require continued presence of promoter-bound sigma54 subunit. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p.636-642, 2002.

BORDES, P.; WIGNESHWERARAJ, S. R.; SCHUMACHER, J.; ZHANG, X.; CHANEY, M. & BUCK, M. The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: identifying a surface that binds sigma 54. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, p. 2278-83, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRODOLIN, K.; ZENKIN, N.; MUSTAEV, A.; MAMAeva, D. & HEUMANN, H. The sigma 70 subunit of RNA polymerase induces lacUV5 promoter-proximal pausing of transcription. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v.11, p. 551-557, 2004.

BRUN, Y. V. & SHAPIRO, L. A temporally controlled sigma-factor is required for polar morphogenesis and normal cell division in *Caulobacter*. **Genes Dev.**, v. 6, p. 2395-2408, 1992.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; CANNON, M. C.; BEYNON, J. L. & CANNON, F. C. Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, v. 294, p. 776-778, 1981.

BUCK, M.; KHAN, H. & DIXON, R. Site-directed mutagenesis of the *Klebsiella pneumoniae nifL* and *nifH* promoters & in vivo analysis of promoter activity. **Nucleic Acids Res.**, v. 13, p. 7621-7638, 1985.

BUCK, M. Deletion analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: importance of spacing between conserved sequences around positions -12 and -24 for activation by the *nifA* and *ntnC* (*glnG*) products. **J. Bacteriol.**, v. 166, p. 545-51, 1986.

BUCK, M. & CANNON, W. Mutations in the RNA polymerase recognition sequence of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter permitting transcriptional activation in the absence of NifA binding to upstream activator sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 2597-2612, 1989.

BUCK, M. & CANNON, W. Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promoter DNA. **Nature**, v. 358, p. 422-424, 1992.

BUCK, M.; GALLEGOS, M. T.; STUDHOLME, D. J.; GUO, Y. & GRALLA, J. D. The bacterial enhancer-dependent  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ) transcription factor. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 4129-4136, 2000.

BURGESS, R. R. Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. **J. Biol. Chem.**, v. 244, p.6168-6176, 1969.

BURGESS, R. R.; TRAVERS, A. A.; DUNN, J. J. & BAUTZ, E. K. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. **Nature**, v. 221, p. 43-46, 1969.

BURROWS, P. C.; SEVERINOV, K.; ISHIHAMA, A.; BUCK, M. & WIGNESHWERARAJ, S. R. Mapping sigma 54-RNA polymerase interactions at the -24 consensus promoter element. **J. Biol.Chem.**, v. 278, p.29728-29743, 2003.

CALI, B. M.; MICCA, J. L. & STEWART, V. Genetic regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 2666-2672, 1989.

CANNON, W.; CLAVERIE MARTIN, F.; AUSTIN, S. & BUCK, M. Identification of a DNA-contacting surface in the transcription factor sigma-54. **Mol. Microbiol.**, v. 11, p. 227-236, 1994.

CANNON, W.; CHANEY, M. & BUCK, M. Characterisation of holoenzyme lacking sigmaN regions I and II. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 27, p. 2478-2486, 1999.

CANNON, W.; GALLEGOS, M. T.; CASAZ, P. & BUCK, M. Amino-terminal sequences of sigmaN (sigma54) inhibit RNA polymerase isomerization. **Genes Dev.**, v. 13, p. 357-370, 1999.

CANNON, W. V.; GALLEGOS, M. T. & BUCK, M. Isomerization of a binary sigma-promoter DNA complex by transcription activators. **Nat. Struct. Biol.**, v. 7, p. 594-601, 2000.

CARMONA, M.; CLAVERIE-MARTIN, F. & MAGASANIK, B. DNA bending and the initiation of transcription at sigma54-dependent bacterial promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, p. 9568-9572, 1997.

CARMONA, M.; de LORENZO, V. & BERTONI, G. Recruitment of RNA polymerase is a rate-limiting step for the activation of the sigma(54) promoter Pu of *Pseudomonas putida*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 33790-33794, 1999.

CASAZ, P.; GALLEGOS, M. T. & BUCK, M. Systematic analysis of sigma54 N-terminal sequences identifies regions involved in positive and negative regulation of transcription. **J. Mol. Biol.**, v. 292, p. 229-239, 1999.

CASLAKE, L. F.; GRUBER, T. M. & BRYANT, D. A. Expression of two alternative sigma factors of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 is modulated by carbon and nitrogen stress. **Microbiology**, v. 143, p. 3807-3818, 1997.

CASTANO, I. & BASTARRACHEA, F. *glnF-lacZ* fusions in *Escherichia coli*: studies on *glnF* expression and its chromosomal orientation. **Mol. Gen. Genet.**, v. 195, p. 228-233, 1984.

CHAMPER, R.; DINGWALL, A. & SHAPIRO, L. Cascade regulation of *Caulobacter* flagellar and chemotaxis genes. **J. Mol. Biol.**, v. 194., p. 71-80, 1987.

CHANEY, M. & BUCK, M. The sigma 54 DNA-binding domain includes a determinant of enhancer responsiveness. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 1200-1209, 1999.

CHANEY, M.; GRANDE, R.; WIGNESHWERARAJ, S. R.; CANNON, W.; CASAZ, P.; GALLEGOS, M. T.; SCHUMACHER, J.; JONES, S.; ELDERKIN, S.; DAGO, A. E.; MORETT, E. & BUCK, M. Binding of transcriptional activators to sigma 54 in the presence of the transition state analog ADP-aluminum fluoride: insights into activator mechanochemical action. **Genes Dev.**, v. 15, p. 2282-2294, 2001.

CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L. & MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 86, p. 2172-2175, 1989.

CLAVERIE-MARTIN, F. & MAGASANIK, B. Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, p. 1631-1635, 1991.

CLAVERIE-MARTIN, F. & MAGASANIK, B. Positive and negative effects of DNA bending on activation of transcription from a distant site. **J. Mol. Biol.**, v. 227, p.996-1008, 1992.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D. & MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, v. 21, p. 536-545, 2002.

COWING, D. W.; BARDWELL, J. C.; CRAIG, E. A.; WOOLFORD, C.; HENDRIX, R. W. & GROSS, C. A. Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 82, p. 2679-2683, 1985.

CRAIG, N. L. & NASH, H. A. *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. **Cell**, v. 39, p. 707-716, 1984.



- CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **App. and. Envir. Microbiol.**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.
- DANDEKAR, T.; SNEL, B.; HUYNEN, M. & BORK, P. Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 324-328, 1998.
- DAUBE, S. S. & von HIPPEL, P. H. Interactions of *Escherichia coli* sigma(70) within the transcription elongation complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, p. 8390-8395, 1999.
- DEBARBOUILLE, M.; MARTIN-VERSTRAETE, I.; KUNST, F. & RAPOPORT, G. The *Bacillus subtilis sigL* gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, p. 9092-9096, 1991.
- de BRUIJN, F. J. & AUSUBEL, F. The cloning and characterization of the *glnF* (*rpoN*) gene of *Klebsiella pneumoniae*: role of *glnF* (*ntrA*) in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilation genes. **Mol. Gen. Genet.**, v.192, p.342-353, 1983.
- DeHASETH, P. L. & HELMANN, J. D. Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. **Mol. Microbiol.**, v.1, p. 817-824, 1995.
- DeMAIO, J.; ZHANG, Y.; KO, C.; YOUNG, D. B. & BISHAI, W. R. A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, p. 2790-2794, 1996.
- DIXON, R.; KENNEDY, C.; KONDOROSI, A.; KRISHNAPILLAI, V.; MERRICK, M. Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. **Mol. Gen. Genet.**, v. 157, p. 189-198, 1977.
- DIXON, R.; EADY, R. R.; ESPIN, G.; HILL, S.; IACCARINO, M.; KAHN, D.; MERRICK, M. Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. **Nature**, v. 286, p. 128-132, 1980.
- DIXON, R. Tandem promoters determine regulation of the *Klebsiella pneumoniae* glutamine synthetase (*glnA*) gene. **Nucleic. Acids. Res.**, v.12, p. 7811-7829, 1984.
- DIXON, R. The *xylABC* promoter from the *Pseudomonas putida* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 203, p. 129-136, 1986.
- DIXON, R. & KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-31, 2004.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; PAULA, M. A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R. *et al.* (eds.). **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 671-676.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 771-774, 1997.

DODD, I. B. & EGAN, J. B. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 5019-5026, 1990.

DRLICA, K. & ROUVIERE-YANIV, J. Histone-like proteins of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 301-319, 1987.

DWORKIN, J.; JOVANOVIĆ, G. & MODEL, P. Role of upstream activation sequences and integration host factor in transcriptional activation by the constitutively active prokaryotic enhancer-binding protein PspF. **J. Mol. Biol.**, v. 273, p. 377-388, 1997.

DWORKIN, J.; NINFA, A. J. & MODEL, P. A protein-induced DNA bend increases the specificity of a prokaryotic enhancer-binding protein. **Genes Dev.**, v. 12, p. 894-900, 1998.

ENGEL, P.; KRAMER, R. & UNDEN, G. Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5533-5539, 1992.

EHRT, S.; ORNSTON, L. N. & HILLEN, W. RpoN (sigma 54) is required for conversion of phenol to catechol in *Acinetobacter calcoaceticus*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 3493-3499, 1994.

ESPINOSA-URGEL, M.; CHAMIZO, C. & TORMO, A. A consensus structure for sigma S-dependent promoters. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 657-659, 1996.

FAREWELL, A.; KVINT, K. & NYSTRÖM, T. Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. **Mol. Microbiol.**, v. 29, p. 1039-1051, 1998.

FENG, J. L.; GOSS, T. J.; BENDER, R. A. & NINFA, A. J. Activation of transcription initiation from the *nac* promoter of *Klebsiella aerogenes*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5523-5534, 1995.

FIGURSKI, D. & HELSINKI, D. R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided by *trans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 1648-1652, 1979.

FINAN, T. M.; WOOD, J. M. & JORDAN, D. C. Symbiotic properties of C4-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. **J. Bacteriol.**, v. 154, p. 1403-1413, 1983.

FISCHER, H. M.; ALVAREZ-MORALES, A. & HENNECKE, H. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: *Bradyrhizobium japonicum nifA* gene is involved in control of *nif* gene expression and formation of determinate symbiosis. **EMBO J.**, v. 5, p. 1165-1173, 1986.

FISCHER, H. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 352-386, 1994.

FLAMM, E. L. & WEISBERG, R. A. Primary structure of the *hip* gene of *Escherichia coli* and of its product, the beta subunit of integration host factor. **J. Mol. Biol.**, v. 183, p.117-128, 1985.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMB, J.-F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M.; MCKENNEY, K.; SUTTON, G.; FITZHUGH, W.; FIELDS, C. A.; GOCAYNE, J. D.; SCOTT, J. D.; SHIRLEY, R.; LIU, L.-I.; GLODEK, A.; KELLEY, J. M.; WEIDMAN, J. F.; PHILLIPS, C. A.; SPRIGGS, T.; HEDBLUM, E.; COTTON, M. D.; UTTERBACK, T. R.; HANNA, M. C.; NGUYEN, D. T.; SAUDEK, D. M.; BRANDON, R. C.; FINE, L. D.; FRITCHMAN, J. L.; FUHRMANN, J. L.; GEOGHAGEN, N. S. M.; GNEHM, C. L.; MCDONALD, L. A.; SMALL, K. V.; FRASER, C. M.; SMITH, H. O. & VENTER, J. C. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v.269, p. 496-512, 1995.

FORWARD, J. A.; BEHRENDT, M. C.; WYBORN, N. R.; CROSS, R. & KELLY, D. J. TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. **J. Bacteriol.**, v.179, p. 5482-5493, 1997.

FRANCO, A. A. & DÖBEREINER, J. A Biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 68-74, 1994.

FREDRICK, K. & HELMANN, J. D. RNA polymerase sigma factor determines start-site selection but is not required for upstream promoter element activation on heteroduplex (bubble) templates. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 94, p. 1171-1176, 1997.

GARCIA, E.; BANCROFT, S.; RHEE, S. G. & KUSTU, S. The product of a newly identified gene, *gInF*, is required for synthesis of

GUO, Y. & GRALLA, J. D. DNA-binding determinants of sigma 54 as deduced from libraries of mutations. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 1239-1245, 1997.

GUO, Y.; WANG, L. & GRALLA, J. D. A fork junction DNA-protein switch that controls promoter melting by the bacterial enhancer-dependent sigma factor. **EMBO J.**, v. 18, p. 3736-3745, 1999.

GUO, Y.; LEW, C. M. & GRALLA, J. D. Promoter opening by sigma(54) and sigma(70) RNA polymerases: sigma factor-directed alterations in the mechanism and tightness of control. **Genes Dev.**, v. 14, p. 2242-2255, 2000.

HACKETTE, S. L.; SKYE, G. E.; BURTON, C. & SEGEL, I. H. Characterization of an ammonium transport system in filamentous fungi with methylammonium-<sup>14</sup>C as the substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 245, p. :4241-4250, 1970.

HALDENWANG, W. G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 01-30, 1995.

HALES, L. M.; GUMPORT, R. I. & GARDNER, J. F. Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 2999-3006, 1994.

HANKE, S. J. T. - **Conjugação e transformação por eletroporação de *Herbaspirillum seropedicae* estirpes Z78, Z152 e Za95.** Curitiba, 1995. Tese-Mestrado em Ciências - Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HARLEY, C. B. & REYNOLDS, R. P. Analysis of *E. coli* promoter sequences. **Nucleic Acids Res.**, v.15, p. 2343-2361, 1987.

HASELKORN, R. Organization of the genes for nitrogen fixation in photosynthetic bacteria and cyanobacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 40, p. 525-547, 1986.

HAWLEY, D. K. & McCLURE, W. R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 11, p. 2237-2255, 1983.

HECKER, M.; SCHUMANN, W. & VOLKER, U. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.**, v. 19, p. 417-428, 1996.

HELMANN, J. D. & CHAMBERLIN, M. Structure and function of bacterial sigma factors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 839-872, 1988.

HELMANN, J. D. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 2875-2882, 1991.

HELMANN, J. D. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, p. 2351-2360, 1995.

HELMANN, J. D. Anti-sigma factors. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, p. 135-141, 1999.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 373-395, 2002.

HICKS, K. A. & GROSSMAN, A. D. Altering the level and regulation of the major sigma subunit of RNA polymerase affects gene expression and development in *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.**, v. 20, p. 201-212, 1996.

HIMMELREICH, R.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; PIRKL, E.; LI, B. & HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 4420-4449, 1996.

HIRSCHMAN, J.; WONG, P. K.; SEI, K.; KEENER, J. & KUSTU, S. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. **Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7525-7529, 1985.

HO, Y. S.; BURDEN, L. M. & HURLEY, J. H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J.**, v. 19, p. 5288-5299, 2000. Erratum in: **EMBO J.**, v. 20, p. 1483, 2001.

HOOVER, T. R.; SANTERO, E.; PORTER S. & KUSTU, S. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. **Cell**, v. 63, p. 11-22, 1990.

HOWITT, S. M. & UDVARDI, M. K. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1465, p. 152-170, 2000.

HSIEH, M. & GRALLA, J. D. Analysis of the N-terminal leucine heptad and hexad repeats of sigma 54. **J. Mol. Biol.**, v. 239, p. 15-24, 1994.

HUGHES, R. & MATHEE, K. The anti-sigma factors. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 52, p. 231-286, 1998.

HUNT, T. P. & MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 8453-8457, 1985.

INOUE, S.; YAMADA, M.; NAKAZAWA, A. & NAKAZAWA, T. Cloning and sequence analysis of the *ntrA* (*rpoN*) gene of *Pseudomonas putida*. **Gene**, v. 85, p. 145-152, 1989.

ISHIHAMA, A. Subunit of assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Adv. Biophys.**, v. 14, p. 1-35, 1981.

ISHIHAMA, A. Promoter selectivity of prokaryotic RNA polymerases. **Trends Genet.**, v. 4, p. 282-286, 1988.

ISHIHAMA, A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 499-518, 2000.

- ISHIMOTO, K. S. & LORY, S. Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 86, p. 1954-1957, 1989.
- JAGANNATHAN, A.; CONSTANTINIDOU, C. & PENN, C. W. Roles of *rpoN*, *fliA*, and *flgR* in expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2937-2942, 2001.
- JANAKIRAMAN, R. S. & BRUN, Y. V. Transcriptional and mutational analyses of the *rpoN* operon in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 5138-5147, 1997.
- JANAUSCH, I. G. & UNDEN, G. The *dcuD* (former *yhcL*) gene product of *Escherichia coli* as a member of the DcuC family of C4-dicarboxylate carriers: lack of evident expression. **Arch. Microbiol.**, v. 172, p. 219-226, 1999.
- JANAUSCH, I. G.; KIM, O. B. & UNDEN, G. DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers. **Arch. Microbiol.**, v. 176, p. 224-230, 2001.
- JANAUSCH, I. G.; ZIENTZ, E.; TRAN, Q. H.; KROGER, A. & UNDEN, G. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1553, p. 39-56, 2002.
- JANGA, S. C. & MORENO-HAGELSIEB, G. Conservation of adjacency as evidence of paralogous operons. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 5392-5397, 2004.
- JEONG, W. & KANG, C. Start site selection at *lacUV5* promoter affected by the sequence context around the initiation sites. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4667-4672, 1994.
- JIANG, J.; GU, B. H.; ALBRIGHT, L. M. & NIXON, B. T. Conservation between coding and regulatory elements of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* *dct* genes. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 5244-5253, 1989.
- JIANG, Z. Y. & BAUER, C. E. Analysis of a chemotaxis operon from *Rhodospirillum centenum*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 5712-5719, 1997.
- JIN, S.; ISHIMOTO, K. & LORY, S. Nucleotide sequence of the *rpoN* gene and characterization of two downstream open reading frames in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 1316-1322, 1994.
- JISHAGE, M.; KVINT, K.; SHINGLER, V. & NYSTROM, T. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. **Genes Dev.**, v. 16, p. 1260-1270, 2002.
- JOHANSSON, M. & NORDLUND, S. Transcription of the *glnB* and *glnA* genes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 142, p. 1265-1272, 1996.
- JONES, R. & HASELKORN, R. The DNA sequence of the *Rhodobacter capsulatus* *nifH* gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 8735, 1988.

JONES, R. & HASELKORN, R. The DNA sequence of the *Rhodobacter capsulatus* *ntrA*, *ntrB* and *ntrC* gene analogues required for nitrogen fixation. **Mol. Gen. Genet.**, v.215, p. 507-516, 1989.

JOVANOVIC, G. & MODEL, P. PspF and IHF bind co-operatively in the *psp* promoter-regulatory region of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 25, p. 473-481, 1997.

JURADO, P.; FERNANDEZ, L. A. & de LORENZO, V. Sigma 54 levels and physiological control of the *Pseudomonas putida* Pu promoter. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 3379-3383, 2003.

KAPANIDIS, A. N.; MARGEAT, E.; LAURENCE, T. A.; DOOSE, S.; HO, S. O.; MUKHOPADHYAY, J.; KORTKHONJIA, E.; MEKLER, V.; EBRIGHT, R. H. & WEISS, S. Retention of transcription initiation factor sigma70 in transcription elongation: single-molecule analysis. **Mol. Cell**, v. 20, p. 347-356, 2005.

KAY, W. W. & KORNBERG, H. L. The uptake of C4-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, v. 18, p. 274-281, 1971.

KELEMEN, G. H.; BROWN, G. L.; KORMANEC, J.; POTUCKOVA, L.; CHATER, K. F. & BUTTNER, M. J. The positions of the sigma-factor genes, *whiG* and *sigF*, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 593-603, 1996.

KELLY, M. T. & HOOVER, T. R. Mutant forms of *Salmonella typhimurium* sigma54 defective in transcription initiation but not promoter binding activity. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3351-3357, 1999.

KELLY, D. J. & THOMAS, G. H. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of Bacteria and Archaea. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 405-424, 2001.

KENNEY, T. J. & MORAN, C. P. Jr. Genetic evidence for interaction of sigma A with two promoters in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 3282-90, 1991.

KESELER, I. M. & KAISER, D. An early A-signal-dependent gene in *Myxococcus xanthus* has a sigma 54-like promoter. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 4638-46, 1995.

KESELER, I. M. & KAISER, D. Sigma54, a vital protein for *Myxococcus xanthus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, p. 1979-1984, 1997.

KHAN, H.; BUCK, M. & DIXON, R. Deletion loop mutagenesis of the *nifL* promoter from *Klebsiella pneumoniae*: role of the -26 to -12 region in promoter function. **Gene**, v. 45, p. 281-288, 1986.

KLASSEN, G., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M., FUNAYAMA, S. & RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 887-891, 1997.



KLASSEN, G.; PEDROSA, F. P.; SOUZA, E. M.; YATES, G. M. & RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 81, p. 165-170, 1999.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 32, p. 87-100, 1985.

KO D. C.; MARR, M. T.; GUO, J. & ROBERTS, J. W. A surface of *Escherichia coli* sigma 70 required for promoter function and antitermination by phage lambda Q protein. **Genes Dev.**, v.12, p. 3276-3285, 1998.

KOHLER, T.; HARAYAMA, S.; RAMOS, J. L. & TIMMIS, K. N. Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 4326-4333, 1989.

KOLESKY, S.; OUHAMMOUCH, M.; BRODY, E. N. & GEIDUSCHEK, E. P. Sigma competition: the contest between bacteriophage T4 middle and late transcription. **J. Mol. Biol.**, v. 291, p. 267-281, 1999.

KRANZ, R. G. & HASELKORN, R. Characterization of *nif* regulatory genes in *Rhodospseudomonas capsulata* using *lac* gene fusions. **Gene**, v. 40, p. 203-215, 1985.

KRUMMEL, B. & CHAMBERLIN, M. J. RNA chain initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. Structural transitions of the enzyme in early ternary complexes. **Biochemistry**, v. 28, p. 7829-7842, 1989.

KULLIK, I.; FRITSCHKE, S.; KNOBEL, H.; SANJUAN, J.; HENNECKE, H. & FISCHER, H. M. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the sigma 54 gene (*rpoN*). **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1125-1138, 1991.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 367-376, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAURIE, A. D.; BERNARDO, L. M.; SZE, C. C.; SKARFSTAD, E.; SZALEWSKA-PALASZ, A.; NYSTROM, T. & SHINGLER, V. The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 1494-1503, 2003.

LEE, S. Y., de La TORRE, A. YAN, D.; KUSTU, S.; NIXON, B. T. & WEMMER, D. E. Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. **Genes Dev.**, v. 17, p. 2552-2563, 2003.

LEONARDO, J. M. & GOLDBERG, R. B. Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 142, p. 99-110, 1980.

LESSARD, I. A.; PRATT, S. D.; McCAFFERTY, D. G.; BUSSIÈRE, D. E.; HUTCHINS, C.; WANNER, B. L.; KATZ, L. & WALSH, C. T. Homologs of the vancomycin resistance D-Ala-D-Ala dipeptidase VanX in *Streptomyces toyocaensis*, *Escherichia coli* and *Synechocystis*

MacFARLANE, S. A. & MERRICK, M. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. **Natl. Acad. Sci. USA**, v. 13, p. 7591-7606, 1985.

MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; SOUZA, E. M. & PEDROSA, F. O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 674-684, 1995.

MACHADO, I. M.; YATES, M. G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M. & PEDROSA, F. O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v 29, p. 1599-1602, 1996.

MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORRUPA, E. & KEMPER, B. Sigle-stranded DNA "blue" T7 promoter plasmids: a versatil tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Protein Engineering**, v. 1, p. 67-74, 1986.

MAEDA, H.; FUJITA, N. & ISHIHAMA, A. Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. **Nucleic Acids. Res.**, v. 28, p. 3497-3503, 2000.

MAGASANIK, B. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, v.16, p. 135-168, 1982.

MARINI, A. M.; MATASSI, G.; RAYNAL, V.; ANDRE, B.; CARTRON, J. P. & CHERIF-ZAHAR, B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. **Nat. Genet.**, v. 26, p. 341-344, 2000

MARTIN-VERSTRAETE, I.; DEBARBOUILLE, M.; KLIER, A. & RAPOPORT, G. Mutagenesis of the *Bacillus subtilis* "-12, -24" promoter of the levanase operon and evidence for the existence of an upstream activating sequence. **J. Mol. Biol.**, v. 226, p. 85-99, 1992.

MARTIN, D. W.; SCHURR, M. J.; YU, H. & DERETIC, V. Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to sigma E and stress response. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 6688-6696, 1994.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W. & PÜHLER, A. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 212, p. 27-37, 1988.

McCLURE, W. R. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p.171-204, 1985.

MECHULAM, Y.; FAYAT, G. & BLANQUET, S. Sequence of the *Escherichia coli* *pheST* operon and identification of the *himA* gene. **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 787-791, 1985.

MEIER-WAGNER, J.; NOLDEN, L.; JAKOBY, M.; SIEWE, R.; KRAMER, R. & BURKOVSKI, A. Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: role of Amt and AmtB. **Microbiology**, v. 147, p. 135-143, 2001.

MERRICK, M.; GIBBINS, J. & TOUKDARIAN, A. The nucleotide sequence of the sigma factor gene *ntrA* (*rpoN*) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. **Mol. Gen. Genet.**, v. 210, p. 323-330, 1987.

MERRICK, M. J. & COPPARD, J. R. Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding sigma 54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from sigma 54-dependent promoters. **Mol. Microbiol.**, v. 3, p. 1765-1775, 1989.

MERRICK, M. J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Symbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman: Hall, New York, 1992. p. 835-876.

MERRICK, M. & CHAMBERS, S. The helix-turn-helix motif of sigma 54 is involved in recognition of the -13 promoter region. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 7221-7226, 1992.

MERRICK, M. J. In a class of its own – the RNA polymerase sigma factor. **Mol. Microbiol.**, v. 10, p. 903-909, 1993.

MERRICK, M. J. & EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 604-622, 1995.

MICHIELS, J.; VAN SOOM, T.; D'HOOGHE, I.; DOMBRECHT, B.; BENHASSINE, T.; DE WILDE, P. & VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium etli* *rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *ptsN*, and *ptsA* mutants. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1729-1740, 1998.

MILCAMP, A.; VAN DOMMELEN, A.; STIGTER, J.; VANDERLEYDEN, J. & DE BRUIJN, F. J. The *Azospirillum brasilense* *rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. **Can. J. Microbiol.**, v. 42, p. 467-478, 1996.

MILLER, H. I.; KIKUCHI, A.; NASH, H. A.; WEISBERG, R. A. & FRIEDMAN, D. I. Site-specific recombination of bacteriophage lambda: the role of host gene products. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 43, p. 112111-112116, 1979.

MILLER, H. I. Primary structure of the *himA* gene of *Escherichia coli*: homology with DNA-binding protein HU and association with the phenylalanyl-tRNA synthetase operon. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 49, p.691-698, 1984.

MINNICH, S. A. & NEWTON, A. Promoter mapping and cell cycle regulation of flagellin gene transcription in *Caulobacter crescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 84, p. 1142-1146, 1987.

MOLINA-LOPEZ, J. A.; GOVANTES, F. & SANTERO, E. Geometry of the process of transcription activation at the sigma 54-dependent *nifH* promoter of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 25419-25425, 1994.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. & CHUBATSU, L. S. In-trans regulation of the N-truncated-NIFA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 180, p. 157-161, 1999.

MOONEY, R. A. & LANDICK, R. Tethering sigma70 to RNA polymerase reveals high in vivo activity of sigma factors and sigma70-dependent pausing at promoter-distal locations. **Genes Dev.**, v. 17, p. 2839-2851, 2003.

MOONEY R. A.; DARST, S. A. & LANDICK, R. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? **Mol. Cell**, v. 20, p. 335-345, 2005.

MORETT, E. & BUCK, M. In vivo studies on the interaction of RNA polymerase-sigma 54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters. The role of NifA in the formation of an open promoter complex. **J. Mol. Biol.**, v. 210, p. 65-77, 1989.

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

MORRIS, L.; CANNON, W.; CLAVERIE-MARTIN, F.; AUSTIN, S. & BUCK, M. DNA distortion and nucleation of local DNA unwinding within sigma-54 (sigma N) holoenzyme closed promoter complexes. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 11563-1156371, 1994.

MUKHOPADHYAY, J.; KAPANIDIS, A. N.; MEKLER, V.; KORTKHONJIA, E., EBRIGHT, Y. W. & EBRIGHT, R. H. Translocation of sigma(70) with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. **Cell**, v.106, p. 453-463, 2001.

MULLIN, D.; MINNICH, S.; CHEN, L. S. & NEWTON, A. A set of positively regulated flagellar gene promoters in *Caulobacter crescentus* with sequence homology to the *nif* gene promoters of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Mol. Biol.**, v. 195, p. 939-943, 1987.

MULLIN, D. A. & NEWTON, A. Ntr-like promoters and upstream regulatory sequence *ptr* are required for transcription of a developmentally regulated *Caulobacter crescentus* flagellar gene. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3218-3227, 1989.

MULLIN, D. A. & NEWTON, A. A sigma 54 promoter and downstream sequence elements *ptr2* and *ptr3* are required for regulated expression of divergent transcription units *flaN* and *flbG* in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 2067-2076, 1993.

MULLIN, D. A & NEWTON, A. Ntr-like promoters and upstream regulatory sequence *ptr* are required for transcription of a developmentally regulated *Caulobacter crescentus* flagellar gene. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3218-3227, 1989.

MURAKAMI, K. S.; MASUDA, S.; CAMPBELL, E. A.; MUZZIN, O. & DARST, S. A. Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. **Science**, v. 296, p.1285-1290, 2002.

MUSHEGIAN, A. R. & KOONIN, E. V. Gene order is not conserved in bacterial evolution. **Trends Genet.**, v.12, p. 289-290, 1996.

NAKAHIGASHI, K.; YANAGI, H. & YURA, T. Isolation and sequence analysis of *rpoH* genes encoding sigma 32 homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, p. 4383-4390, 1995.

NASH, H. A., ROBERTSON, C. A., FLAMM, E., WEISBERG, R. A. & MILLER, H. I. Overproduction of *Escherichia coli* integration host factor, a protein with nonidentical subunits. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 4124-4127, 1987.

NEUWALD, A. F.; ARAVIND, L.; SPOUGE, J. L. & KOONIN, E. V. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Res.**, v. 9, p. 27-43, 1999.

NICHOLSON, W. L.; SUN, D. X.; SETLOW, B. & SETLOW, P. Promoter specificity of sigma G-containing RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*: identification of a group of forespore-specific promoters. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 2708-2718, 1989.

NICKELS, B. E.; MUKHOPADHYAY, J.; GARRITY, S. J.; EBRIGHT, R. H. & HOCHSCHILD, A. The sigma 70 subunit of RNA polymerase mediates a promoter-proximal pause at the *lac* promoter. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 11, p.544-550, 2004.

NINFA, A. J.; MULLIN, D. A.; RAMAKRISHNAN, G. & NEWTON, A. *Escherichia coli* sigma 54 RNA polymerase recognizes *Caulobacter crescentus flbG* and *flaN* flagellar gene promoters in vitro. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 383-391, 1989.

NEUWALD, A. F.; ARAVIND, L.; SPOUGE, J. L. & KOONIN, E. V. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Res.**, v. 9, p. 27-43, 1999.

NOHNO, T. & SAITO, T. Two transcriptional start sites found in the promoter region of *Escherichia coli* glutamine permease operon, *glnHPQ*. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, p. 2777, 1997.

NOINDORF, L.; REGO, F. G.; BAURA, V. A.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O. & CHUBATSU, L. S. Characterization of the *orfIglnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch Microbiol.**, v. 185, p. 55-62, 2006.

OGURA, T. & WILKINSON, A. J. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. **Genes Cells**, v. 6, p. 575-597, 2001.

- OHTA, N.; CHEN, L. S.; SWANSON, E. & NEWTON, A. Transcriptional regulation of a periodically controlled flagellar gene operon in *Caulobacter crescentus*. **J. Mol. Biol.**, v. 186, p. 107-115, 1985.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Occurrence of the endopjytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* spp. in roots, stems and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OVERBEEK, R.; FONSTEIN, M.; D'SOUZA, M.; PUSCH, G. D. & MALTSEV, N. The use of gene clusters to infer functional coupling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, p. 2896-2901, 1999.
- OW, D. W.; XIONG, Y.; GU, Q. & SHEN, S. C. Mutational analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: sequences essential for positive control by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) products. **J. Bacteriol.**, v. 161, p. 868-874, 1985.
- PAGET, M. S. B. & HELMANN, J. D. The sigma70 family of sigma factors. **Genome Biol.**, v. 4, p. 203.1-203.6, 2003.
- PAULSEN, I. T.; SLIWINSKI, M. K. & SAIER M. H. Jr. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. **J. Mol. Biol.**, v. 277, p. 573-592, 1998.
- PEDROSA, F. O. & YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p. 95-101, 1984
- PEDROSA, F. O. Fixação Biológica de Nitrogênio: Fértil Idéia. **Ciência Hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.
- PEDROSA, F. O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. .M .P.; STEFFENS, M. B. R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E. M.; MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; ISHIDA, M. L.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 843-846, 1997.
- PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.**, v. 91, p.189-195, 2001.
- PEREZ-MARTIN, J.; TIMMIS, K. N. & de LORENZO, V. Co-regulation by bent DNA. Functional substitutions of the integration host factor site at sigma 54-dependent promoter Pu of the upper-TOL operon by intrinsically curved sequences. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 22657-22662, 1994.
- PEREZ-MARTIN, J. & de LORENZO, V. Integration host factor suppresses promiscuous activation of the sigma 54-dependent promoter Pu of *Pseudomonas putida*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 92, p. 7277-7281, 1995.

PERSUN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. & RIGO, L. L. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.192, p.217-221, 2000.

POPHAM, D. L.; SZETO, D; KEENER, J. & KUSTU, S. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhances. **Science**, v. 243, p. 629-635, 1989.

PORTER, S. C.; NORTH, A. K.; WEDEL, A. B. & KUSTU, S. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. **Genes Dev.**, v. 7, p. 2258-2273, 1993.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982a, 246p.

POSTGATE, J. R. Biological nitrogen fixation: Fundamentals. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 296, p.375-385, 1982b.

POSTGATE, J. **Nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 3<sup>o</sup> ed, 1998. 112p.

POTUCKOVA, L.; KELEMEN, G. H.; FINDLAY, K. C.; LONETTO, M. A.; BUTTNER, M. J. & KORMANEC, J. A new RNA polymerase sigma factor, sigma F, is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp. **Mol. Microbiol.**, v. 17, p. 37-48,1995.

POWELL, B. S.; COURT, D. L.; INADA, T.; NAKAMURA, Y.; MICHOTEY, V.; CUI, X.; REIZER, A.; SAIER, M. H. Jr. & REIZER, J. Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p.4822-4839, 1995.

PREDICH, M.; NAIR, G. & SMITH, I. *Bacillus subtilis* early sporulation genes *kinA*, *spo0F*, and *spo0A* are transcribed by the RNA polymerase containing sigma H. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 2771-2778, 1992.

RAINA, S.; MISSIAKAS, D. & GEORGOPOULOS, C. The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 14, p. 1043-1055, 1995.

REGO, F. G. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; WASSEM, W.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U. & SOUZA, E. M. The expression of *nifB* gene from *Herbaspirillum seropedicae* is dependent upon the NifA and RpoN proteins. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 1199-1207, 2006.

REITZER, L. J. & MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA**, v. 82, p. 1979-1983, 1985.



REITZER, L. J. & MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. **Cell**, v. 45, p. 785-792, 1986.

REITZER, L. & SCHNEIDER, B. Metabolic context and possible physiological themes of  $\sigma^{54}$ -dependent genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 422-444, 2001.

REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 155-176, 2003.

REZNIKOFF, W. S.; SIEGELE, D. A.; CO

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. A.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R. & SOUZA, E. M. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, v. 35, p. 261-270, 2003.

RONSON, C. W.; LYTTLETON, P. & ROBERTSON, J. G. C(4)-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 78, p. 4284-4288, 1981.

RONSON, C. W.; ASTWOOD, P. M. & DOWNIE, J. A. Molecular cloning and genetic organization of C4-dicarboxylate transport genes from *Rhizobium leguminosarum*. **J. Bacteriol.**, v. 160, p. 903-909, 1984.

RONSON, C. W.; NIXON, B. T.; ALBRIGHT, L. M. & AUSUBEL, F. M. *Rhizobium meliloti ntrA (rpoN)* gene is required for diverse metabolic functions. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 2424-2431, 1987a.

RONSON, C. W.; ASTWOOD, P. M.; NIXON, B. T. & AUSUBEL, F. M. Deduced products of C4-dicarboxylate transport regulatory genes of *Rhizobium leguminosarum* are homologous to nitrogen regulatory gene products. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, p. 7921-7934, 1987b.

ROUVIERE, P. E.; DE LAS PENAS, A.; MECSAS, J.; LU, C. Z.; RUDD, K. E. & GROSS, C. A. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 14, p. 1032-1042, 1995.

SAIER, M. H. Jr. Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 40, p.81-136, 1998.

SAIER, M. H. Jr.; ENG, B. H.; FARD, S.; GARG, J.; HAGGERTY, D. A.; HUTCHINSON, W. J.; JACK, D. L.; LAI, E. C.; LIU, H. J.; NUSINEW, D. P.; OMAR, A. M.; PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; QUAN, J. A.; SLIWINSKI, M.; TSENG, T. T.; WACHI, S. & YOUNG, G. B. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1422, p. 1-56, 1999.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULT, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THEBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBACH, J. & BOUCHER, C. A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, v. 415, p. 497-502, 2002.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

- SANTERO, E.; LUQUE, F.; MEDINA, J. R. & TORTOLERO, M. Isolation of *ntrA*-like mutants of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 166, p. 541-544, 1986.
- SANTERO, E.; TOUKDARIAN, A.; HUMPHREY, R. & KENNEDY, C. Identification and characterization of two nitrogen fixation regulatory regions, *nifA* and *nfrX*, in *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum*. **Mol. Microbiol.**, v. 2, p. 303-314, 1988.
- SASSE-DWIGHT, S. & GRALLA, J. D. Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor sigma 54. **Cell**, v. 62, p. 945-954, 1990.
- SAUER, U.; SANTANGELO, J. D.; TREUNER, A.; BUCHHOLZ, M. & DURRE, P. Sigma factor and sporulation genes in *Clostridium*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 331-340, 1995.
- SCHMITZ, G.; DURRE, P.; MULLENBACH, G. & AMES, G. F. Nitrogen regulation of transport operons: analysis of promoters *argTr* and *dhuA*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 209, 403-407, 1987.
- SCHOLL, D. & NIXON, B. T. Cooperative binding of DctD to the *dctA* upstream activation sequence of *Rhizobium meliloti* is enhanced in a constitutively active truncated mutant. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 26435-26442, 1996.
- SCHWARTZ, E.; GERISCHER, U. & FRIEDRICH, B. Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes. **J. Bacteriol.**, v. 180, p.3197-3204, 1998.
- SEOL, W. & SHATKIN, A. J. *Escherichia coli kgtP* encodes an alpha-ketoglutarate transporter. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 88, p. 3802-3806, 1991. Erratum in: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, v. 88, p. 5477, 1991.
- SERVIN-GONZALEZ, L.; ORTIZ, M.; GONZALEZ, A. & BASTARRACHEA, F. *glnA* mutations conferring resistance to methylammonium in *Escherichia coli* K12. **J. Gen. Microbiol.**, v. 133, p. 1631-1639, 1987.
- SHAW, J. G.; HAMBLIN, M. J. & KELLY, D. J. Purification, characterization and nucleotide sequence of the periplasmic C4-dicarboxylate-binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 3055-3062, 1991.
- SHIMAMOTO, N.; KAMIGOCHI, T. & UTIYAMA, H. Release of the sigma subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase depends mainly on time elapsed after the start of initiation, not on length of product RNA. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 11859-11865, 1986.
- SHINGLER, V. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Mol. Microbiol.**, v. 19, p. 409-416, 1996.
- SIEWE, R. M.; WEIL, B.; BURKOVSKI, A.; EIKMANN, B. J.; EIKMANN, M. & KRAMER, R. Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 5398-5403, 1996.

SIX, S.; ANDREWS, S. C.; UNDEN, G. & GUEST, J. R. *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). **J. Bacteriol.**, v. 176, p.6470-6478, 1994.

SOUTHERN, E. & MERRICK, M. The role of region II in the RNA polymerase sigma factor sigma(N) (sigma(54)). **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 2563-2570, 2000.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. & PEDROSA, F. O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 425-429, 1991a.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; YATES, M. G. & PEDROSA, F. O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microb.**, v. 137, p. 1511-1522, 1991b.

SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U. & YATES, M. G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B. & YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

STENBERG, F.; CHOVANEC, P.; MASLEN, S. L.; ROBINSON, C. V.; ILAG, L. L.; VON HEIJNE, G. & DALEY, D. O. Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 34409-34419, 2005.

STIGER, J.; SCANEIDER, M. & BRUJIN, F. J. **Mol. Plant Microbe Interac.**, v. 6, p. 238-252, 1993.

STUDHOLME, D. J. & DIXON, R. Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 1757-1767, 2003.

SUN, D.; FAJARDO-CAVAZOS, P.; SUSSMAN, M. D.; TOVAR-ROJO, F.; CABRERA-MARTINEZ, R. M. & SETLOW, P. Effect of chromosome location of *Bacillus subtilis* forespore genes on their *spo* gene dependence and transcription by E sigma F: identification of features of good E sigma F-dependent promoters. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 7867-7874, 1991.

SYED, A. & GRALLA, J. D. Identification of an N-terminal region of sigma 54 required for enhancer responsiveness. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 5619-5625, 1998.

SZE, C. C.; LAURIE, A. D. & SHINGLER, V. In vivo and in vitro effects of integration host factor at the DmpR-regulated sigma(54)-dependent Po promoter. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2842-2851, 2001.

SZETO, W. W.; NIXON, B. T.; RONSON, C. W. & AUSUBEL, F. M. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate

regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 1423-1432, 1987.

TARTOF, K. D. & HOBBS, C. A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. **Bethesda Res. Lab Focus**, v. 9, p. 12, 1987.

TATTI, K. M.; SHULER, M. F. & MORAN, C. P. Jr. Sequence-specific interactions between promoter DNA and the RNA polymerase sigma factor E. **J. Mol. Biol.**, v. 253, p. 08-16, 1995.

TAYLOR, M.; BUTLER, R.; CHAMBERS, S.; CASIMIRO, M.; BADI, F. & MERRICK, M. The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor sigma N plays a role in promoter recognition. **Mol. Microbiol.**, v. 22, p. 1045-1054, 1996.

THOMAS, G. H.; MULLINS, J. G. & MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 331-344, 2000.

THOMAS, G.; COUTTS, G. & MERRICK, M. The *glnKamtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes. **Trends Genet.**, v. 16, p. 11-14, 2000.

THONY, B.; FISCHER, H. M.; ANTHAMATTEN, D.; BRUDERER, T. & HENNECKE, H. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, p. 8479-8499, 1987.

THOMPSON, R. J. & MOSIG, G. Integration host factor (IHF) represses a *Chlamydomonas* chloroplast promoter in *E. coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 3313-3326, 1988.

THÖNY, B. & HENNECKE, H. The -24/-12 promoter comes of age. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 63, p. 341-358, 1989.

TINTUT, Y.; WONG, C.; JIANG, Y.; HSIEH, M. & GRALLA, J. D. RNA polymerase binding using a strongly acidic hydrophobic-repeat region of sigma 54. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, p. 2120-2124, 1994.

TINTUT, Y.; WANG, J. T. & GRALLA, J. D. Abortive cycling and the release of polymerase for elongation at the sigma 54-dependent *glnAp2* promoter. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 24392-24398, 1995.

TOTTEN, P. A.; LARA, J. C. & LORY, S. The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 389-396, 1990.

TOUKDARIAN, A. & KENNEDY, C. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. **EMBO J.**, v. 5, p. 399-407, 1986.

TRAVERS, A. A. & BURGESS, R. R. Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. **Nature**, v. 222, p. 537-540, 1969.

UENO-NISHIO, S.; BACKMAN, K. C. & MAGASANIK, B. Regulation at the *glnL*-operator-promoter of the complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 153, p. 1247-1251, 1983.

ULLMANN, R.; GROSS, R.; SIMON, J.; UNDEN, G. & KROGER, A. Transport of C(4)-dicarboxylates in *Wolinella succinogenes*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5757-5764, 2000.

UNDEN, G. & BONGAERTS, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1320, p. 217-234, 1997.

VALE, R. D. AAA proteins. Lords of the ring. **J. Cell Biol.**, v. 150, p. F13-9, 2000.

VALLS, M.; BUCKLE, M. & de LORENZO, V. In vivo UV laser footprinting of the *Pseudomonas putidasigma* 54Pu promoter reveals that integration host factor couples transcriptional activity to growth phase. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 2169-2175, 2002.

van BERKUM, P. & BOHLOOL, B. B. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. **Microbiol. Rev.**, v. 44, p. 491-517, 1980.

van RIJN, P. A.; van de PUTTE, P. & GOOSEN, N. Analysis of the IHF binding site in the regulatory region of bacteriophage Mu. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 2825-2834, 1991.

van SLUYS, M. A.; OLIVEIRA, M.C.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MIYAKI, C. Y.; FURLAN, L. R.; CAMARGO, L. E. A.; SILVA, A. C. R.; MOON, D.H.; TAKITA, M. A.; LEMOS, E. G. M.; MACHADO, M. A.; FERRO, M. I. T.; SILVA, F. R.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H.; LEMOS, M. V. F.; EL-DORRY, H.; TSAI, S.M.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; DE OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L. R.; SIQUEIRA, W. J.; COUTINHO, L. L.; KIMURA, E. T.; FERRO, E. S.; HARAKAVA, R.; KURAMAE, E. E.; MARINO, C. L.; GIGLIOTI, E.; ABREU, I. L.; ALVES, L. M. C.; AMARAL, A. M.; BAIA, G. S.; BLANCO, S. R.; BRITO, M. S.; CANNAVAN, F. S.; CELESTINO, A. V.; CUNHA, A. F.; FENILLE, R. C.; FERRO, J. A.; FORMIGHIERI, E. F.; KISHI, L. T.; LEONI, S. G.; OLIVEIRA, A. R.; ROSA, V. E. JR.; SASSAKI, F. T.; SENA, J. A. D.; SOUZA, A. A.; TRUFFI, D.; TSUKUMO, F.; YANAI, G. M.; ZAROS, L. G.; CIVEROLO, E. L.; SIMPSON, A. J. G.; ALMEIDA, N. F. JR.; SETUBAL, J. C. & KITAJIMA, J.P. Comparative Analyses of the Complete Genome Sequences of Pierce's Disease and Citrus Variegated Chlorosis Strains of *Xylella fastidiosa*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 1018-1026, 2003.

von HIPPEL, P. H.; BEAR, D. G.; MORGAN, W. D. & McSWIGGEN, J. A. Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 389-446, 1984.

WANG, J. T.; SYED, A.; HSIEH, M. & GRALLA, J. D. Converting *Escherichia coli* RNA polymerase into an enhancer-responsive enzyme: role of an NH<sub>2</sub>-terminal leucine patch in sigma 54. **Science**, v., 270, p. 992-994, 1995.

WANG, J. T. & GRALLA, J. D. The transcription initiation pathway of sigma 54 mutants that bypass the enhancer protein requirement. Implications for the mechanism of activation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 32707-32713, 1996.

WANG, J. T.; SYED, A. & GRALLA, J. D. Multiple pathways to bypass the enhancer requirement of sigma 54 RNA polymerase: roles for DNA and protein determinants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, p. 9538-9543, 1997.

WANG L. & GRALLA, J. D. Multiple in vivo roles for the -12-region elements of sigma 54 promoters. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 5626-5631, 1998.

WANG, L.; GUO, Y. & GRALLA, J. D. Regulation of sigma 54-dependent transcription by core promoter sequences: role of -12 region nucleotides. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 7558-7565, 1999.

WANG, L. & GRALLA, J. D. Roles for the C-terminal region of sigma 54 in transcriptional silencing and DNA binding. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 8979-8986, 2001.

WANG, X. Y.; KOLB, A.; CANNON, W. & BUCK, M. Nucleoprotein complex formation by the enhancer binding protein *nifA*. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3478-3485, 1997a.

WANG, Y. K.; LEE, J. H.; BREWER, J. M. & HOOVER, T. R. A conserved region in the sigma54-dependent activator DctD is involved in both binding to RNA polymerase and coupling ATP hydrolysis to activation. **Mol. Microbiol.**, v. 26, p.373-386, 1997b.

WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. & BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 756-764, 2000.

WEDEL, A. & KUSTU, S. The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. **Genes Dev.**, v. 9, p. 2042-2052, 1995.

WEINMAN, J. J.; FELLOWS, F. F.; GRESSHOFF, P. M.; SHINE, J. & SCOTT, K. F. Structural analysis of the genes encoding the molybdenum-iron protein of nitrogenase in the *Parasponia rhizobium* strain ANU289. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, p. 8329-8344, 1984.

WELCH, R. A.; BURLAND, V.; PLUNKETT, G. 3rd; REDFORD, P.; ROESCH, P.; RASKO, D.; BUCKLES, E. L.; LIU, S. R.; BOUTIN, A.; HACKETT, J.; STROUD, D.; MAYHEW, G. F.; ROSE, D. J.; ZHOU, S.; SCHWARTZ, D. C.; PERNA, N. T.; MOBLEY, H. L.; DONNENBERG, M. S. & BLATTNER, F. R. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, p. 170201702-4, 2002.

WIGNESHWERARAJ, S. R.; CHANEY, M. K.; ISHIHAMA, A. & BUCK, M. Regulatory sequences in sigma 54 localize near the start of DNA melting. **J. Mol. Biol.**, v.306, p. 681-701, 2001.

WIGNESHWERARAJ, S. R.; ISHIHAMA, A. & BUCK, M. In vitro roles of invariant helix-turn-helix motif residue R383 in sigma(54) (sigma(N)). **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p. 1163-1174, 2001.

WIGNESHWERARAJ, S. R.; KUZNEDELOV, K.; SEVERINOV, K. & BUCK, M. Multiple roles of the RNA polymerase beta subunit flap domain in sigma 54-dependent transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 3455-3465, 2003.

WONG, P. K.; POPHAM, D.; KEENER, J. & KUSTU, S. In vitro transcription of the nitrogen fixation regulatory operon *nifLA* of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 2876-2880, 1987.

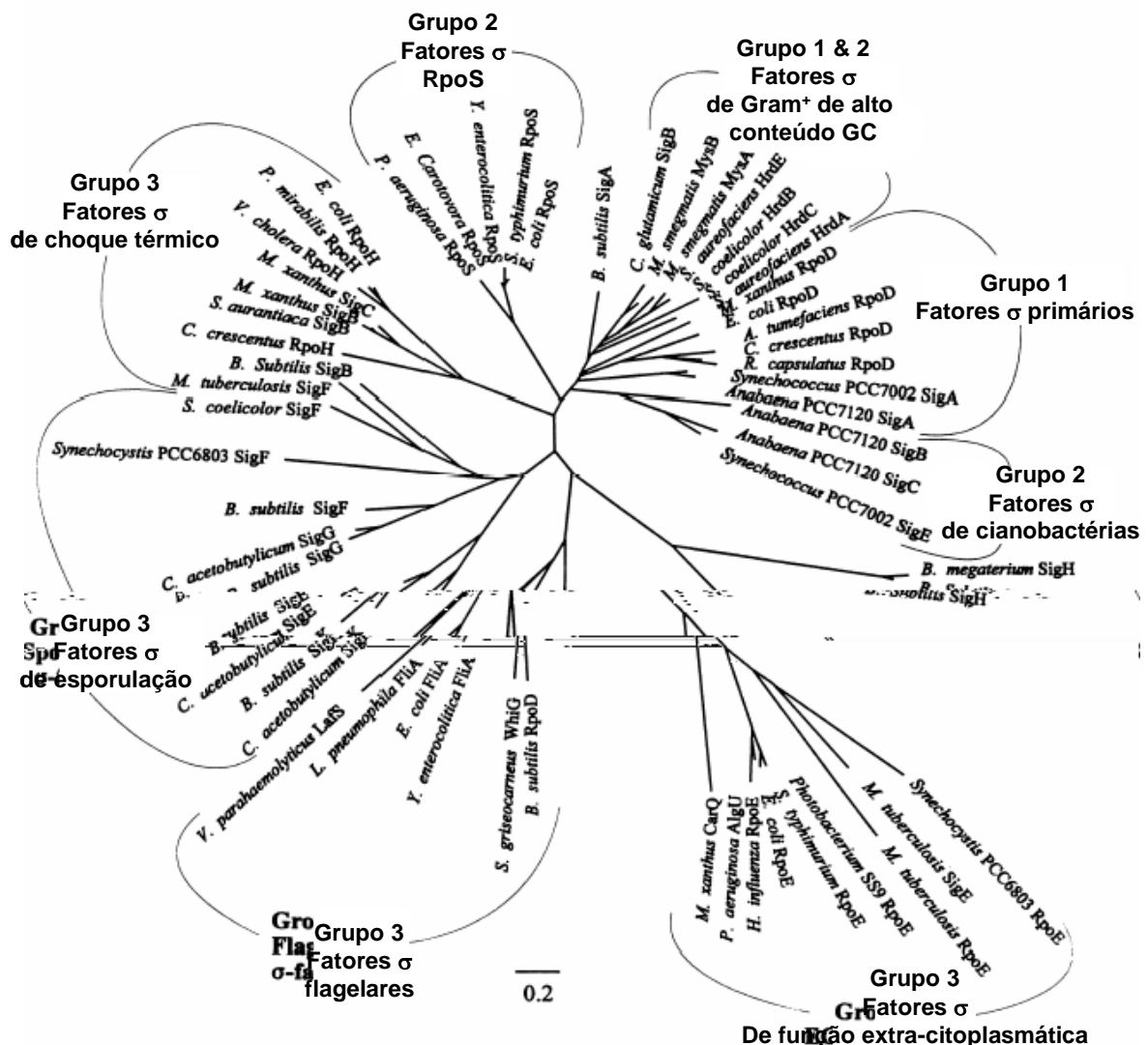
WONG, C. & GRALLA, J. D. A role for the aci



- YURA, T.; NAGAI, H. & MORI, H. Regulation of the heat-shock response in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 47, p. 321-350, 1993.
- ZHANG, X.; CHANEY, M.; WIGNESHWERARAJ, S. R.; SCHUMACHER, J. BORDES, P.; CANNON, W. & BUCK, M. Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. **Mol. Microbiol.**, v. 45, p. 895-903, 2002.
- ZHENG, L.; HALBERG, R.; ROELS, S.; ICHIKAWA, H.; KROOS, L. & LOSICK, R. Sporulation regulatory protein GerE from *Bacillus subtilis* binds to and can activate or repress transcription from promoters for mother-cell-specific genes. **J. Mol. Biol.**, v. 226, p. 1037-1050, 1992.
- ZHOU, Y. N.; WALTER, W. A. & GROSS, C. A. A mutant sigma 32 with a small deletion in conserved region 3 of sigma has reduced affinity for core RNA polymerase. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5005-5012, 1992.
- ZIENTZ, E.; JANAUSCH, I. G.; SIX, S. & UNDEN, G. Functioning of DcuC as the C4-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3716-3720, 1999.
- ZIENTZ, E.; SIX, S. & UNDEN, G. Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C4-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 7241-7247, 1996.
- ZIMMER, D. P.; SOUPENE, E.; LEE, H. L.; WENDISCH, V. F.; KHODURSKY, A. B.; PETER, B. J.; BENDER, R. A. & KUSTU, S. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 19, p. 14674-14679, 2000.

## **ANEXOS**

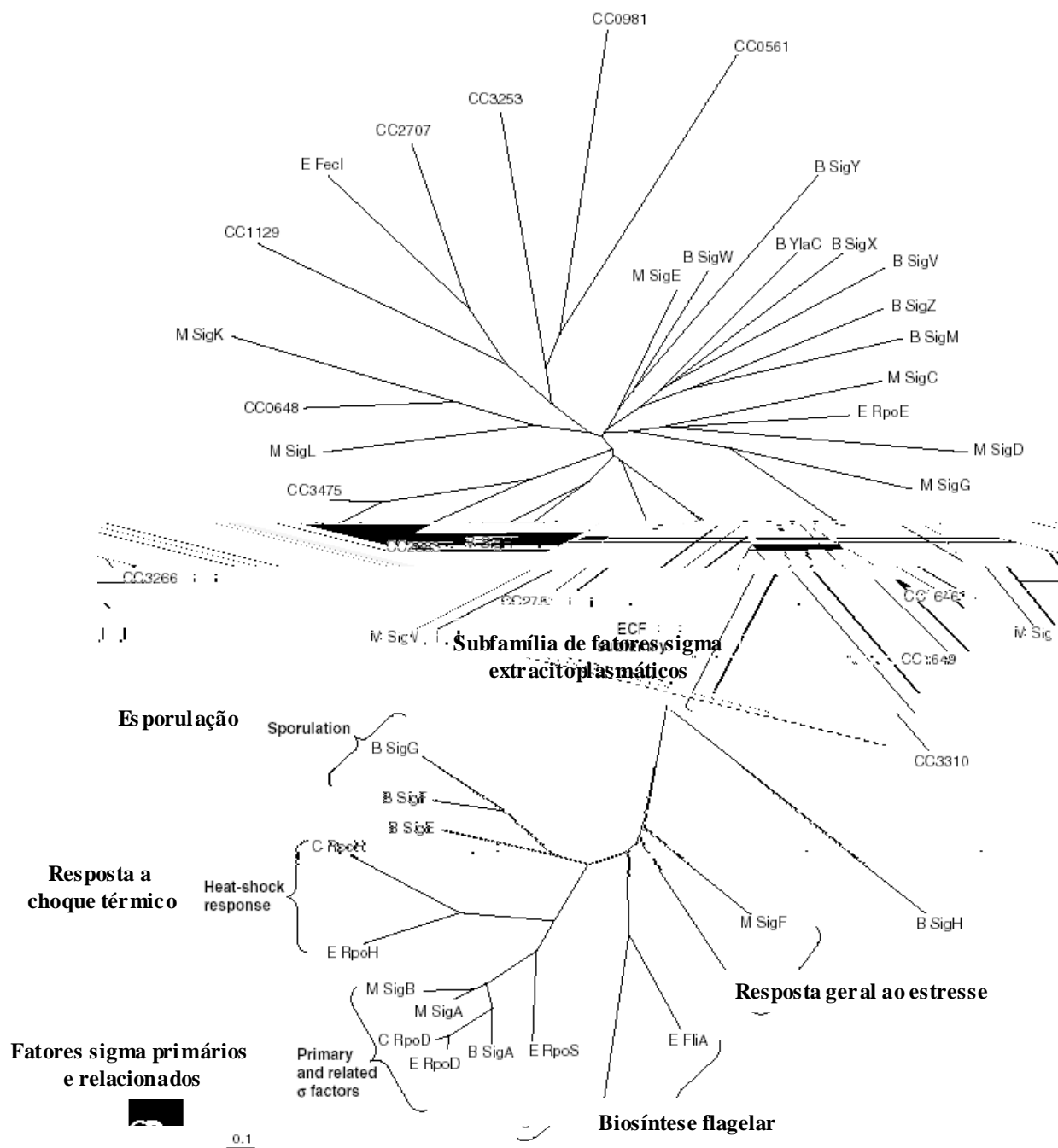
ANEXO 1. Relação filogenética dos fatores sigma da família  $\sigma^{70}$



A seqüência usada no alinhamento foi traduzida do Genbank com o número de acesso em parênteses: *Escherichia coli* RpoE (P34086), KatF (X16400), RpoH (M20668), FliA (L36677), RpoD (U23083); *Salmonella typhimurium* RpoE (P34086), RpoS (U05011); *Streptomyces aureofaciens* HrdE (M90412), HrdA (M90410); *Haemophilus influenzae* RpoE (P44790); *Photobacterium* sp. strain SS9 (L41688); *Pseudomonas aeruginosa* AlgU (U49151), RpoS (D26134); *Mycobacterium tuberculosis* RpoE (Z95120), SigE (U87242), SigF (Z92771); *Myxococcus xanthus* CarQ (X71062), SigB (X55500), RpoD (U20669), SigC (L12992); *Synechocystis* sp. strain PCC6803 RpoE (D90906), SigF (D90906); *Bacillus megaterium* SigH (X59070); *Yersinia enterocolitica* FliA (L33466), RpoS (U22043); *Bacillus subtilis* SigH (M29693), SigF (M15744), SigA (M10089), SigB (M34995), SigE (p06222), SigK (M15744), SigG (X57547), RpoD (M20144); *Clostridium acetobutylicum* SigG (U07420), SigE (Z23079), SigK (L23317); *Streptomyces coelicolor* HrdB (X52983), HrdC (P18184), SigF (L11648); *Stigmatella aurantiaca* SigB (Z14970); *Rhodobacter capsulatus* RpoD (Z68306); *Proteus mirabilis* RpoH (D50830); *Agrobacterium tumefaciens* RpoD (P33452); *Streptomyces griseocarnus* WhiG (X68709); *Vibrio parahaemolyticus* LafS (U52957); *Mycobacterium smegmatis* MysB (U09863), MysA (U09821); *Caulobacter crescentus* RpoD (U35138), RpoH (U39791); *Synechococcus* sp. strain PCC7002 SigA (U15574), SigE (U82485); *Anabaena* sp. strain PCC7120 SigA (M60046), SigC (M95759), SigB (M95760); *Corynebacterium glutamicum* SigB (Z49824); *Erwinia carotovora* RpoS (U66542); *Legionella pneumophila* FliA (X98892); *Vibrio cholerae* RpoH (U44432). A árvore foi gerada pelo programa Fitch de empacotamento Phylip versão 3,5c usando correções de distância baseada em matriz PAM de múltiplos alinhamento de sequencias usando o programa Multalin versão 4,0.

Fonte: WÖSTEN, 1989

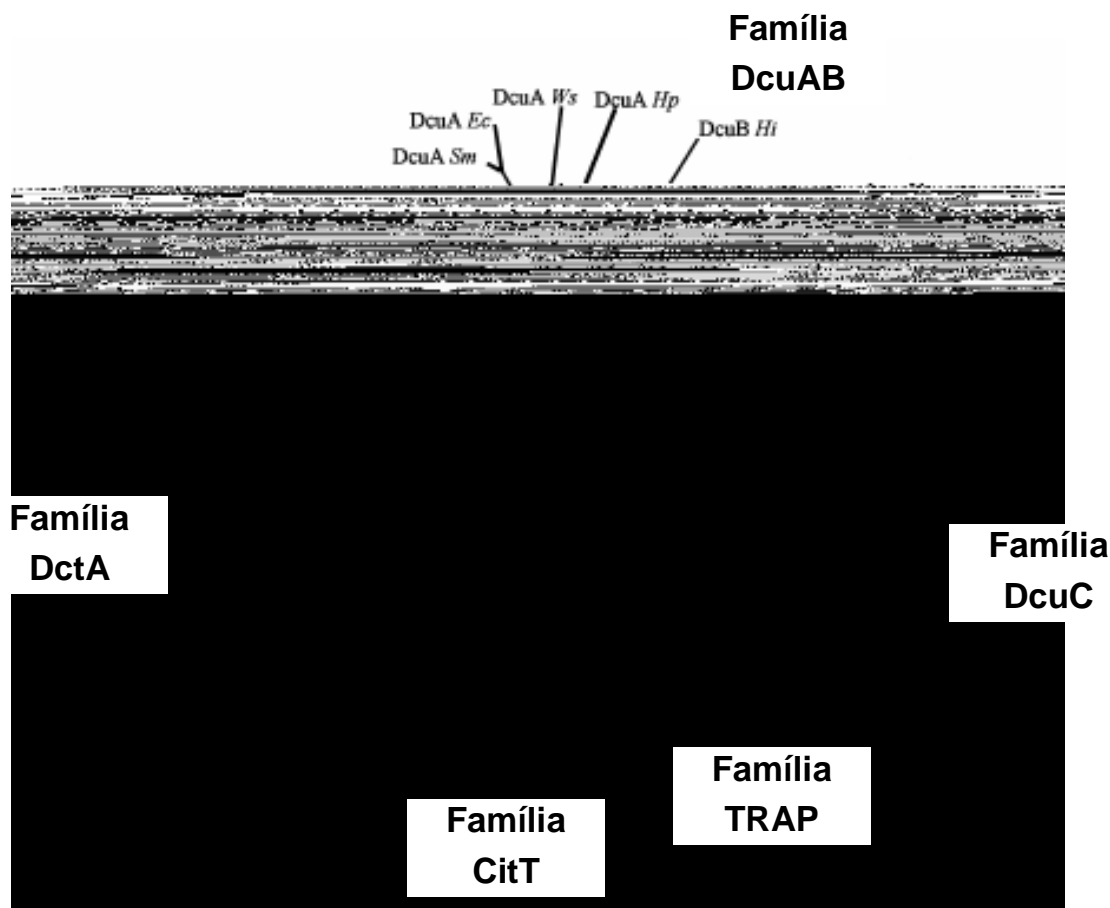
ANEXO 2. Relação filogenética entre os membros da família  $\sigma^{70}$



Relação filogenética entre os membros da família  $\sigma^{70}$  das bactérias *E. coli* (E), *Caulobacter crescentus* (CC ou C), *B. subtilis* (B) e *Mycobacterium tuberculosis* (M). Os fatores  $\sigma$  pertencentes aos grupos 1, 2 e 3 estão divididos em grupos funcionalmente relacionados (esporulação, biosíntese de flagelos, resposta geral ao estresse e resposta a choque térmico e divergem do grupo 4, que tem função extra-citoplasmática (FEC). A distância entre a subfamília FEC e os demais membros da família  $\sigma^{70}$  é particularmente notável, bem como a divergência dentro da própria subfamília. Apenas regiões conservadas (2 e 4) foram incluídas no alinhamento.

Fonte: PAGET & HELMANN, 2003

ANEXO 3. Relação filogenética da família de carreadores de ácidos C<sub>4</sub>-dicarboxílicos:



Famílias de carreadores de C<sub>4</sub>-carboxilatos bacterianos (DctA, DcuAB, DcuC, CitT e TRAP). As famílias foram baseadas na comparação de seqüência de proteína. As distâncias fornecem as diferença sem resíduos de aminoácidos idênticos dos carreadores ou produtos gênicos correspondentes (potencias). Para a comparação foi utilizado o programa Clustal W (abertura:10; fim: 10; extendimento: 0,05 e penalidade de intervalo de separação: 0,05).

Abreviações de estirpes: *Bj*, *Bradyrhizobium japonicum*; *Bs*, *Bacillus subtilis*; *Cd*, *Corynebacterium diphtheriae*; *Cg*, *C. glutamicum*; *Ec*, *Escherichia coli*; *Hi*, *Haemophilus influenzae*; *Hp*, *Helicobacter pylori*; *Mt*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pm*, *Pasteurella multocida*; *Rc*, *Rhodobacter capsulatus*; *Rl*, *Rhizobium leguminosarum*; *Sc*, *Streptomyces coelicolor*; *Sm*, *Serratia marcescens*; *Srm*, *Sinorhizobium meliloti*; *Vc*, *Vibrio cholerae*; *Ws*, *Wolinella succinogenes*.

Fonte: JANAUSCH et al., 2002

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)