

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Isolamento e caracterização do gene *fur* de
Bradyrhizobium elkanii

Roberto Farina

Dissertação submetida ao Programa de Pósgraduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

Porto Alegre
Março de 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo apoio que sempre recebi, bem como pela liberdade para eu tomar minhas próprias decisões. Tenho convicção certa que isso foi de fundamental importância para a minha formação.

Agradecimentos

À professora Luciane Maria Pereira Passaglia, pelos ensinamentos, pela paciência e pela possibilidade de realizar esse trabalho.

À minha querida família, por todo carinho, conselhos e amizade.

À minha namorada Jamilla, por toda paciência e apoio nos momentos difíceis. Com certeza essa conquista é tua também, pois tua ajuda foi essencial.

À Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), por ceder as estirpes de *B. elkanii* utilizadas no trabalho.

À Samanta Campos, pelos ensinamentos e por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À todos os colegas do Núcleo de Microbiologia Agrícola, Adriana Giongo, Adriana Ambrosini, Anelise Beneduzi, Natália Cobalchini, Pedro Beschoren da Costa e Samanta Campos.

À toda gurizada do Laboratório de Genética Molecular Vegetal. Em especial ao Gustavo, Japonês, João, Júlio, Lauro e Rafa (Cancha).

À todos colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal.

Ao Fernando e a Shana, grandes amigos que muito me ajudaram com material e dicas.
Aos integrantes do projeto “Brasileiros que Cantam Brasileiros (Dani, Fé, Gui e Ronald) pelo companheirismo e pelas muitas noites de cantoria.

Aos meus amigos, pelo incentivo e descontrações.

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

**A sorrir
Eu pretendo levar a vida
Pois chorando
Eu vi a mocidade perdida**

Angenor de Oliveira (Cartola)



SUMÁRIO

Abreviaturas	9
Resumo	11
Abstract	13
1. Introdução	15
1.1. O gênero <i>Bradyrhizobium</i>	15
1.2. O ferro e sua importância para os microrganismos	20
1.3. A regulação do metabolismo bacteriano mediada por ferro	23
1.3.1. O gene <i>fur</i> e a proteína Fur	23
1.3.2. Regulação gênica coordenada pela proteína Fur	24
1.3.3. Os genes regulados pela proteína Fur	28
1.3.4. O controle do gene <i>fur</i> e a relação com o estresse oxidativo	29
1.3.5. O gene <i>fur</i> e sua proteína correspondente no gênero <i>Bradyrhizobium</i> e bactérias relacionadas	31
1.4. Outros genes metal dependentes e suas respectivas proteínas	32
1.4.1. Zur	32
1.4.2. PerA	33
1.4.3. Mur	33
1.4.4. Irr	35
1.4.5. O regulador RirA	40
2. Objetivos	44
3. Material e Métodos	45
3.1. Descrição das bactérias e plasmídeos utilizados nesse trabalho	45
3.1.1. Linhagens bacterianas	45
3.1.2. Plasmídeos	45
3.2. Isolamento, clonagem e sequenciamento do gene <i>fur</i> de <i>B. elkanii</i> SEMIA 587	45
3.2.1. Extração de DNA genômico de <i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i>	45
3.2.2. Amplificação de um fragmento de 297 pb, correspondente a uma região conservada do gene <i>fur</i>	46
3.2.2.1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de amplificação em cadeia (PCR)	46
3.2.2.2. Clonagem do fragmento	48

amplificado em pGEMTEasy (Promega), extração de plasmídeo, sequenciamento e análise das seqüências	
3.3. Southern- <i>blot</i> genômico para comparação entre <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> e análise do número de cópias do gene <i>fur</i>	49
3.4. Obtenção da região reguladora do gene <i>fur</i> de <i>B. elkanii</i>	50
3.4.1. Construção de uma biblioteca genômica parcial de <i>B. elkanii</i>	50
3.4.2. Estratégia de <i>Site-Finding-PCR</i>	51
3.4.3. <i>Site-Finding</i> : incorporação de oligonucleotídeos <i>SiteFinders</i> no genoma bacteriano	52
3.4.4. <i>Nested PCR</i>	53
3.4.5. Clonagem, sequenciamento e análise dos produtos de PCR	54
3.5. Análise de expressão do gene <i>fur</i> de <i>B. elkanii</i>	54
3.6. Construção de mutantes nulos de <i>B. elkanii</i> para o gene <i>fur</i>	55
3.6.1. Obtenção do cassete contendo os genes <i>aph</i> e <i>uidA</i>	55
3.6.2. Introdução do cassete ao fragmento contido no plasmídeo pGEM- <i>fur</i>	56
3.6.3. Clonagem do cassete- <i>fur</i> no vetor conjugativo pSUP 202	56
3.6.4. Conjugação entre <i>E. coli</i> S17-1 e <i>B. elkanii</i> SEMIA 587	57
3.6.5. Análise das bactérias trans-conjugantes	57
4. Resultados	58
4.1. Isolamento, clonagem e sequenciamento do gene <i>fur</i> de <i>B. elkanii</i>	58
4.2. Comparação entre os genomas de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> em relação ao número de cópias e tamanho dos fragmentos contendo o gene <i>fur</i>	62
4.3. Tentativa da obtenção da região reguladora do gene <i>fur</i> através da construção de uma biblioteca genômica parcial	63
4.4. Obtenção da região reguladora do gene <i>fur</i> pela estratégia de <i>Site-Finding-PCR</i>	66
4.5. Análise da seqüência do gene <i>fur</i> de	71

<i>B. elkanii</i> e de sua região reguladora	
4.6. Análise da atividade da região promotora do gene <i>fur</i> de <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	75
4.7. Construção de mutantes nulos de <i>B. elkanii</i> para o gene <i>fur</i>	77
5. Discussão	82
6. Conclusões	89
7. Referência bibliográficas	90
7.1. Fontes de Internet	113

Abreviaturas

ABC	<i>ATP-Binding-Cassette</i>
AMP	adenosina monofosfato
BLAST	<i>Base Local Alignment and Search Tool</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase I	desoxirribonuclease
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i>
FBN	fixação biológica do nitrogênio
Fe	ferro
Fe ²⁺	íon ferroso
Fe ³⁺	íon férrico
HRM	motivo regulador de heme
H ₂	hidrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ICE	elemento que controla ferro
Kb	quilobase
KDa	quilodaltons
LM	Levedura manitol
LB	Luria-Bertani
M	mol
mL	microlitro
mM	Micromolar
Mn ²⁺	íon manganês
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NCBI-USA	Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos
OD	densidade ótica
ONPG	orto-nitro-fenil-β-galactopiranosídeo
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanogramas
P	significância estatística
pb	par de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGPR	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i>
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomole
rDNA	DNA ribossomal
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola
TCA	Ciclo do ácido tricloroacético
U	unidade
Zn	Zinco
Zn ²⁺	íon zinco
μg	micrograma
μL	Microlitro

μM
 μm

Micromolar
micrômetro

Resumo

O ferro é um elemento limitante para o crescimento de plantas e microrganismos. Ele participa em muitos dos principais processos biológicos, como a fotossíntese, a fixação de nitrogênio, metanogênese, produção e consumo de H₂, respiração, ciclo do ácido tricloroacético (TCA), transporte de oxigênio, regulação gênica e biossíntese do DNA. Se por um lado a disponibilidade de ferro é limitante, por outro, o excesso de ferro intracelular pode ser deletério, pois ele geralmente reage com espécies de oxigênio, através da reação de Fenton, que danificam componentes celulares. Assim, as células têm desenvolvido sistemas para garantir a entrada suficiente de ferro na célula para suprir as necessidades fisiológicas, mas, ao mesmo tempo, minimizar a toxicidade desse elemento.

Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* fixam nitrogênio atmosférico em simbiose com soja [*Glycine max* (L.) Merrill], induzindo a formação de nódulos nas raízes, permanecendo nestes como bacteróides fixadores de nitrogênio. Essa associação planta-bactéria é de grande interesse, pois oferece benefícios econômicos e ecológicos. O nitrogênio é um dos nutrientes mais limitantes para as culturas em geral, e a f

foi verificado que essa região promotora responde à presença de ferro, ativando a expressão do gene *lacZ*, em um sistema heterólogo. Com a provável obtenção de mutantes para o gene *fur* de *B. elkanii*, obteve-se a indicação de que a proteína Fur não é essencial para *B. elkanii*, assim como para *B. japonicum*, diferentemente do observado para outras bactérias, como *Rh. leguminosarum*.

Abstract

Iron is a limiting growth factor to plants and microorganisms. It is important in many key biological processes such as photosynthesis, nitrogen fixation, methanogenesis, H₂ production and consumption, cell respiration, trichloroacetic acid cycle (TCA), oxygen transport, gene regulation and DNA biosynthesis. If in one hand the iron availability is limiting, on the other hand the excessive intracellular iron presence can be deleterious because it usually reacts with oxygen species through the Fenton's reaction, which damages cellular components. Cells have developed different systems to ensure a sufficient iron uptake to meet the physiological needs while minimizing the toxicity of this element.

Bradyrhizobium sp fix atmospheric nitrogen in symbiosis with soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] by inducing the formation of nodules in roots, in which they become bacteroids that fix nitrogen. The plant-bacteria association is of great interest because it brings both economic and ecologic benefits. Nitrogen is one of the most limiting nutrients for crops, and the biological nitrogen fixation from the symbiosis rhizobia/legume is the most efficient and cheap way to provide the culture needs. *Bradyrhizobium japonicum* species, the North American inoculant, has several systems characterized, differently from *B. elkanii* species, used as inoculant only in Brazil. However, in spite of both species sharing common features, enough to be considered as one species in the past, years of research had shown that there are genetic and physiological characteristics specific to each one.

The present work a fragment with almost the entire sequence of the gene *fur* of *B. elkanii*, which is responsible for the regulation of the iron metabolism in response to the metal availability, as well as the promoter region was isolated. A high degree of conservation of the *fur* gene-coding region of *B. elkanii* was obtained matching with the

same gene in different bacteria. Southern blot experiments showed that there is a single copy of this gene in both *B. elkanii* 587 and *B. japonicum* 5079, and that these genomes differ in the hybridization patterns for this gene. The regulating region was analyzed with the BPRM program and a region with probability of acting as a transcription promoter for the *fur* gene of *B. elkanii* was identified. It was also observed that this promoter region responds to the presence of iron, activating the *lacZ* gene expression in a heterologous system. Analysis of putative *fur* mutant strains of *B. elkanii* indicated that the Fur protein is not essential to *B. elkanii*, as well as it is not essential in *B. japonicum*, differently to what was observed in other bacteria, such as *Rhizobium leguminosarum*.

1. Introdução

1.1. O gênero *Bradyrhizobium*

São diversos os tipos de microrganismos encontrados na região de contato entre as raízes vegetais e o solo, o rizoplano. As bactérias que estimulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* – PGPR) (Antoun *et al.*, 1998; Alami *et al.*, 2000; Harvey *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2004). Microrganismos diazotróficos, por sua vez, são aqueles capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia, devido ao processo denominado de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esses microrganismos podem ser PGPRs de vida livre, que obtêm energia de compostos orgânicos do solo (fixação livre), ou endossimbiontes, que utilizam fotossintetizados fornecidos por determinadas plantas no estabelecimento de relações simbióticas específicas (fixação simbiótica) (van Loon e Bakker, 2003). O processo de FBN requer um gasto energético elevado e, no caso da fixação simbiótica, é realizado pelas PGPRs coletivamente referidas como ‘rizóbios’, que fixam nitrogênio em simbiose com plantas da família Fabaceae (leguminosas), com algumas raras ocorrências de nodulação em plantas não leguminosas (Willems, 2007).

Rizóbios (família Rhizobiaceae) são bactérias estritamente aeróbias, quimioorganotróficas, com a forma de bastonetes não formadores de esporos, Gram-negativas, com um tamanho que varia de 0,5-0,9 µm x 1,2-3,0 µm. Sua mobilidade é dada por um flagelo polar único ou dois a seis flagelos peritríqueos (Somasegaram e Hoben, 1994). Normalmente encontradas no solo, fixam nitrogênio atmosférico em simbiose com leguminosas e algumas plantas não leguminosas, induzindo a formação de nódulos nas

raízes, permanecendo nestas como bacteróides fixadores de nitrogênio. Aproximadamente 65% do nitrogênio presente na biosfera é oriundo da redução biológica do nitrogênio atmosférico à amônia, através da simbiose rizóbio/leguminosa (Lodwig e Poole, 2003). Essa associação planta-bactéria é de grande interesse agrônomo, pois oferece benefícios econômicos e ecológicos. O nitrogênio é um dos nutrientes mais limitantes para as culturas em geral e a fixação biológica de nitrogênio, através da simbiose rizóbio/leguminosa, é uma forma barata e eficiente de suprir as necessidades de cultivo (Geurts e Bisseling, 2002). A inoculação com rizóbios eficientes supre totalmente a necessidade de adubação nitrogenada nas lavouras, gerando uma economia de, pelo menos, R\$ 2,87 bilhões anuais (Campo e Hungria, 2004; Menna *et al.*, 2006), além de minimizar os danos ambientais causados pela fertilização química.

O sucesso da inoculação com rizóbios depende, em parte, da capacidade de permanência das estirpes introduzidas no solo. Uma característica importante dos rizóbios introduzidos é a capacidade de competir com rizóbios e outros microrganismos nativos, quando estes estão presentes no solo em densidades altas (Triplett e Sadowsky, 1992; Tas *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 2000). Algumas características que podem determinar direta ou indiretamente a competitividade dos rizóbios (ou bradirrizóbios) introduzidos no solo são a motilidade, a produção de polissacarídeos, a produção de bacteriocinas e a capacidade de captação de ferro do ambiente, através da produção de sideróforos.

Inicialmente, os rizóbios foram agrupados em um único gênero, *Rhizobium* Frank 1889 (Kuykendall *et al.*, 2005). Jordan (1982) sugeriu uma separação taxonômica baseada em curvas de crescimento, para diferenciar os rizóbios de multiplicação rápida (*Rhizobium*) daqueles de multiplicação lenta (*Bradyrhizobium*). Esse último gênero era composto por apenas uma espécie, *B. japonicum*, isolada a partir de nódulos de raízes de soja. Embora o

termo rizóbio tenha sido primeiramente utilizado para designar bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, mais recentemente ele vem sendo usado para todas bactérias capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em associação com leguminosas e/ou que pertençam a um gênero correlato (Willems, 2007).

Atualmente, os rizóbios estão distribuídos nos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) e *Azorhizobium* (Lafay e Burdon, 1998; Michiels *et al.*, 1998; Vásquez-Arroyo *et al.*, 1998; Perret *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2002; Willems *et al.*, 2003). A partir da década de 1980, o uso de ferramentas de genética molecular (hibridização DNA-DNA e seqüenciamento do rDNA), juntamente com técnicas moleculares mais modernas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) e seqüenciamentos genômicos, levaram à modificação e reorganização taxonômica dos gêneros existentes e à descrição de novos gêneros (Willems, 2007). Além dos gêneros citados acima, *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001), *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001), *Ralstonia* (Chen *et al.*, 2001), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2002), *Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005) e *Cupriavidus* (Barret e Parker, 2006) possuem espécies capazes de fixar nitrogênio atmosférico em nódulos formados em raízes e em caules de plantas hospedeiras, podendo ser, também, denominados de rizóbios, como mencionado anteriormente (Willems, 2007).

Entre os rizóbios melhor estudados, as espécies pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* apresentam um grande interesse agrônômico, pois tais bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com muitas leguminosas, especialmente com a soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) e *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) são os rizóbios de multiplicação lenta associados a essa leguminosa. No entanto, no Brasil, apenas

estirpes das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* são utilizadas comercialmente como inoculantes para a soja (Peres e Vidor, 1980; Alberton *et al.*, 2006).

Apesar das muitas características em comum existentes entre as espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*, que já foram consideradas como uma só espécie, anos de pesquisa demonstraram que existem características genéticas e fisiológicas que são particulares a cada uma delas. Em um estudo comparativo entre 40 estirpes de rizóbios, Boddey e Hungria (1997), evidenciaram a existência de diferenças fenotípicas marcantes entre as espécies *B. elkanii* e *B. japonicum*, em relação a diversos parâmetros. Entre estes se destacam: 1) As estirpes pertencentes à espécie *B. elkanii* apresentam resistência aos antibióticos estreptomicina, espectinomicina e tetraciclina, enquanto que as estirpes pertencentes à espécie *B. japonicum* são sensíveis ou apresentam baixa resistência a estes antibióticos; 2) As estirpes de *B. japonicum* apresentaram uma expressão positiva da atividade de hidrogenase (gene *hup*), enquanto que as estirpes de *B. elkanii* não apresentaram atividade dessa enzima; e 3) A produção de ácido indol acético foi significativamente maior (cerca de seis vezes) nas estirpes de *B. elkanii* do que nas estirpes de *B. japonicum*. Entre as estirpes analisadas, os autores incluíram USDA 110, a qual é uma estirpe referência para a espécie *B. japonicum*, e SEMIA 587, pertencente à espécie *B. elkanii* e que foi isolada, em 1967, de solos cultivados com soja no Estado do Rio Grande do Sul (Peres, 1979).

Anteriormente aos estudos citados acima, Stanley e colaboradores, em 1985, já havia evidenciado polimorfismos genéticos entre as estirpes pertencentes às espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*, que, previamente à sua separação em espécies, eram divididas em genótipo I e genótipo II, respectivamente. Usando como sonda um fragmento de DNA contendo os genes *nifDH* e outro contendo os genes *nod*, ambos de *Rhizobium meliloti*, os

autores separaram marcadamente esses dois grupos. Resultados similares foram obtidos por Minamisawa (1990), que, utilizando como sonda os genes *nifDK* e *nifE*, dividiu os grupos claramente em genótipos I e II. A ausência de atividade de hidrogenase nas estirpes de *B. elkanii* foi confirmada pelos experimentos de hibridização realizados por Minamisawa *et al.* (1992), nos quais apenas nos DNAs extraídos de estirpes de *B. japonicum* foram obtidas bandas de hibridização. Finalmente, em 1993, Rumjanek e colaboradores, através do seqüenciamento parcial da região codificadora do gene do rRNA 16S, demonstraram que uma região de 188 pares de bases era suficiente para gerar agrupamentos que separaram *B. japonicum* de *B. elkanii*.

Atualmente, a estirpe *B. japonicum* USDA 110 é a única representante do gênero *Bradyrhizobium* que possui seu genoma completamente seqüenciado (Kaneko *et al.*, 2002). Em contraste, um número muito pequeno de seqüências correspondentes ao genoma de *B. elkanii* está disponível e existem poucos trabalhos publicados sobre a genética desta espécie. As principais seqüências publicadas são relativas à região de genes ribossomais, genes *nif* e genes *nod* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos – NCBI-USA).

Desde 1992, são quatro as linhagens autorizadas para uso em inoculantes no Brasil: *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019 e *B. japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 – de acordo com a Coleção de Cultura de *Rhizobium* SEMIA (Seção de Microbiologia Agrícola) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), instituição pública responsável pela manutenção e distribuição das estirpes utilizadas comercialmente no país. A estirpe USDA110 é utilizada comercialmente em culturas de soja nos Estados Unidos e Canadá (Boiero *et al.*, 2007).

1.2. O ferro e sua importância para os microrganismos

O ferro, elemento de número 26 da tabela periódica, é o segundo metal (após o alumínio) e o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre. Possui a capacidade de aceitar e doar elétrons prontamente, interconvertendo-se entre a forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}) (Benite *et al.*, 2002). Ele pode, também, adotar diferentes estados de *spin* (alto ou baixo) em ambas as formas férrica e ferrosa, dependendo do seu ligante. Essas propriedades fazem do ferro um componente prostético extremamente versátil para incorporação em proteínas como um biocatalista ou um carregador de elétrons. Ele compreende mais de 35% da massa do planeta Terra. Entretanto, sua solubilidade é restrita a $1,4 \times 10^{-9}$ M para pH 7,0 (Chipperfield e Ratledge, 2000; Ratledge e Dover, 2000), pela predominância da forma oxidada Fe^{3+} .

Devido a sua baixa solubilidade, o ferro é um elemento limitante para o crescimento de plantas e microrganismos, exceto para alguns lactobacilos (Pandey *et al.*, 1994; Neilands, 1995), que desenvolveram mecanismos para suprir essa carência nutricional (Guerinot *et al.*, 1990; Atlas e Bartha, 1998). Ele participa em muitos dos principais processos biológicos como a fotossíntese, a fixação de nitrogênio, metanogênese, produção e consumo de H_2 , respiração, ciclo do ácido tricloroacético (TCA), transporte de oxigênio, regulação gênica e biossíntese do DNA (revisado em Andrews *et al.*, 2003). Isso porque muitas proteínas fundamentais à vida são metaloproteínas ou metaloenzimas, atuando nas catálises, desempenhando papel estrutural e ativando processos bioquímicos (Butler, 1998). Muitos dos processos já citados, como a fotossíntese, a respiração e a fixação de nitrogênio, envolvem transformações eletrônicas, e é nesse processo que as metaloenzimas atuam. Normalmente, essas enzimas contêm ferro, além de outros metais que podem

assumir vários estados oxidativos.

Se por um lado a disponibilidade de ferro é limitante pela predominância da forma férrica insolúvel em ambientes aeróbicos, por outro lado, o excesso de ferro intracelular pode ser deletério, pois ele geralmente reage com espécies de oxigênio, através da reação de Fenton, que danificam componentes celulares (Braun e Killmann, 1999; Touati, 2000). Assim, as células têm desenvolvido sistemas para garantir a entrada suficiente de ferro na célula para manter a necessidade fisiológica, mas, ao mesmo tempo, minimizar a toxicidade desse elemento.

Para auxiliar na captação do ferro, a maioria das bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e fungos produz sideróforos, moléculas de baixo peso molecular que apresentam alta especificidade e afinidade por ferro férrico (Andrews *et al.*, 2003; Carrilo e Vazquez, 1992; Neilands, 1993; 1995). Sideróforos são sintetizados no citoplasma e secretados através da membrana citosólica em resposta à restrição de ferro. Aproximadamente 500 tipos diferentes de sideróforos já foram caracterizados, os quais podem ser classificados de acordo com o grupo funcional que eles usam como ferro-ligante: catecóis, hidroxamatos ou α -hidroxicarboxilatos (Neilands, 1981; Neilands, 1993; Reigh e O'Connell, 1993; Neilands, 1995; LeVier e Guerinot, 1996; Stevens *et al.*, 1999; Yeoman *et al.*, 2000).

Como microrganismos de vida livre, os rizóbios devem possuir um meio de solubilizar ferro e de competir por ele com outros organismos presentes no solo (Fabiano *et al.*, 1995; LeVier e Guerinot, 1996; Duhan e Dudeja, 1999). Além disso, a captação de ferro é fator limitante para a fixação biológica de nitrogênio, uma vez que o ferro está diretamente envolvido em muitas moléculas que fazem parte desse processo, como o complexo da nitrogenase, a leg-hemoglobina, a ferredoxina, a hidrogenase e os citocromos

(Yeoman *et al.*, 2000). A importância do ferro para os rizóbios se reflete em mais de uma centena de sideróforos conhecidos e na variação dos sistemas de captação do complexo sideróforo- Fe^{3+} (LeVier e Guerinot, 1996). Rizóbios de vida livre não apenas produzem e importam seus próprios sideróforos, mas, também, podem se beneficiar da disponibilidade de sideróforos exógenos, que são produzidos por outros organismos no solo, desde que possuam proteínas receptoras na membrana externa, específicas para o sideróforo em questão. Esse evento é chamado de sinergismo interestirpe. *B. japonicum*, por exemplo, utiliza ferricromo, um sideróforo do tipo hidroxamato derivado de fungos (Plessner *et al.*, 1993). Algumas estirpes de *B. japonicum* são capazes de utilizar o ácido cítrico como sideróforo, uma vez que o ácido solubiliza o ferro, tornando-o disponível pela bactéria (Guerinot *et al.*, 1990).

Além dos sideróforos, existem outras fontes de ferro bacterianas. Fontes de ferro de bactérias patogênicas são transferrina e lactoferrina, proteínas com uma alta afinidade pelos íons Fe^{3+} encontrados em fluídos sanguíneos (Rudolph *et al.*, 2006). Transferrina e lactoferrina atuam como transportadores de ferro e proteínas de armazenagem, que contribuem para a proteção contra a toxicidade de ferro e infecções microbianas. Outra fonte de ferro é o grupamento heme, que é um grupo prostético de muitas enzimas, consistindo em um átomo de ferro contido no centro de um grande anel orgânico, chamado de porfirina (Rudolph *et al.*, 2006). O heme é altamente tóxico e se liga primeiramente em proteínas tais como hemoglobina, hemopexina ou albumina. Localizada nas células sanguíneas vermelhas, a hemoglobina funciona como um transportador de oxigênio. A capacidade do uso da hemoglobina como uma fonte de ferro em condições de baixa concentração desse metal é, entretanto, não restrita a bactérias patogênicas, mas parece ser uma característica comum também nos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e

Bradyrhizobium (Noya *et al.*, 1997). No solo, rizóbios de vida livre podem se deparar com grupamentos heme derivados de hemoproteínas de organismos em decomposição (Rudolph *et al.*, 2006).

1.3. A regulação do metabolismo bacteriano mediada por ferro

1.3.1. O gene *fur* e a proteína Fur

As bactérias geralmente regulam seu metabolismo de ferro em resposta à disponibilidade do metal. Em *E. coli* e muitas outras bactérias essa regulação é mediada pela proteína Fur (*ferric- uptake regulator*) codificada pelo gene *fur* (Escolar *et al.*, 1999). Fur foi primeiramente descrita em 1978 como um repressor de genes regulados por ferro em *Salmonella typhimurium* (Ernst *et al.*, 1978). Três anos depois, Hantke (1981) descreveu um mutante de *E. coli* que se comportava como se a expressão de todas as funções inibidas por ferro (produção de sideróforos e produção de proteínas de membrana externa) fossem constitutivamente expressas. Esse mutante, que se comportava como o mutante de *Salmonella*, descrito anteriormente por Ernst e colaboradores (1978), foi nomeado *fur* e seu comportamento sugeria claramente que uma repressão metal-dependente era a base do controle exercido por ferro em muitos, senão em todos, genes ferro-responsivos. O gene *fur* foi subsequentemente mapeado (Bagg e Neilands, 1985), clonado (Hantke, 1984) e seqüenciado (Schaffer *et al.*, 1985), sua proteína correspondente foi purificada (Wee *et al.*, 1988) e alguns aspectos básicos do mecanismo de regulação foram elucidados (Bagg e Neilands, 1987, Hantke, 1981, 1984).

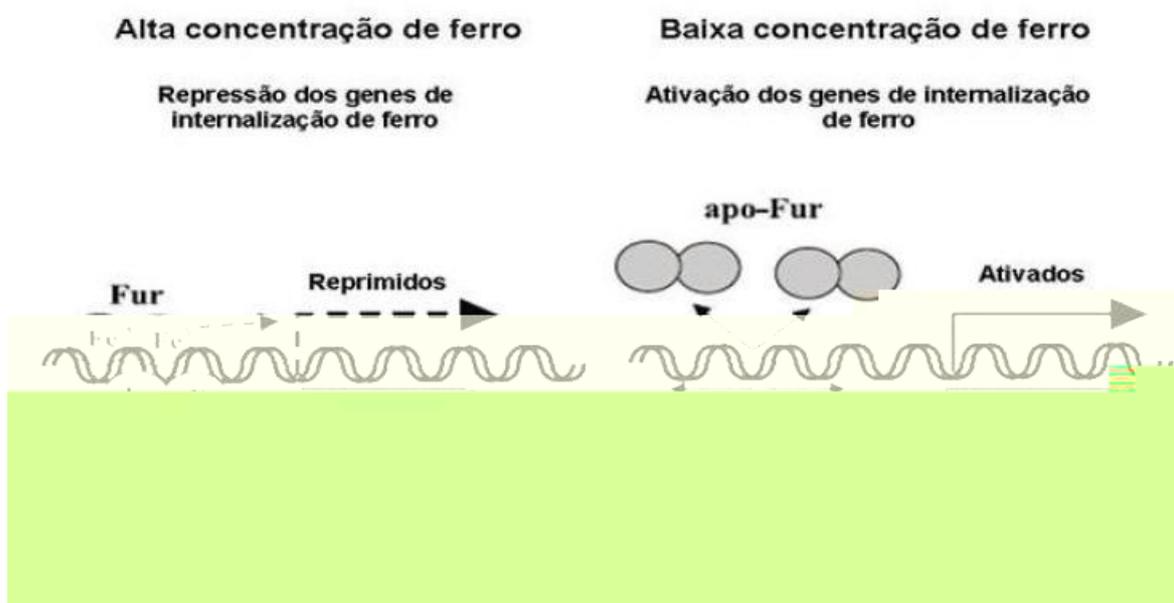
Fur é uma metaloproteína dimérica, composta por subunidades de 17 KDa. No caso de *E. coli*, cada subunidade de Fur pode ser dividida em dois domínios. Um domínio N-terminal, que se liga ao DNA, e outro domínio C-terminal, rico em resíduos de histidina. O

domínio C-terminal provavelmente se liga ao ferro, seu co-efetor, como veremos posteriormente, e é responsável, também, pela dimerização (Andrews *et al.*, 2003).

Cada subunidade de Fur apresenta dois átomos de zinco (não regulatórios). Um desses átomos está fortemente ligado e parece ter uma função estrutural, enquanto que o segundo átomo de zinco pode ser facilmente removido por quelantes. Além disso, Fur contendo um átomo de Zn^{2+} é suficiente para se ligar ao DNA, e a afinidade não aumenta quando o segundo sítio de Zn^{2+} está ocupado (Althaus *et al.*, 1999). Muitos grupos têm demonstrado que o átomo de Zn^{2+} estrutural da proteína Fur de *E. coli* encontra-se ligado a um sítio que inclui os resíduos Cys-92 e Cys-95, localizados na metade C-terminal de cada subunidade (González *et al.*, 1999; Jacquamet *et al.*, 1998). Entretanto, essas cisteínas não são conservadas em muitas proteínas Fur.

1.3.2. Regulação gênica coordenada pela proteína Fur

A proteína Fur, na maioria dos casos, atua como um repressor positivo, reprimindo a transcrição de seus genes-alvo quando interage com o Fe^{2+} , seu co-repressor. Na ausência de Fe^{2+} ocorre a desrepressão dos genes (Figura 1, Andrews *et al.*, 2003). Um íon de ferro se liga a cada subunidade de Fur. Quando ligada ao metal, a afinidade da proteína Fur de *E. coli* por seu sítio de ligação no DNA aumenta em aproximadamente 1.000 vezes (Andrews *et al.*, 2003). Em *B. japonicum* a afinidade de Fur por seu alvo no DNA aumenta 30 vezes na presença do metal (Friedman and O'Brian, 2004). Acredita-se que Fur bloqueia o acesso da RNA-polimerase ao promotor, reprimindo a transcrição, mas isso ainda não foi demonstrado diretamente. Também não se sabe ao certo se Fur exclui um ativador ou recruta um repressor (Friedman and O'Brian, 2003).



O complexo Fe^{2+} -Fur normalmente se liga entre os sítios -35 e -10 dos promotores de genes reprimidos por Fur. O sítio de ligação da proteína Fur foi inicialmente classificado como uma seqüência consenso palindrômica de 19 pares de bases (pb) conhecida como *iron-box* ou *Fur-box* (GATAATGATAATCATTATC) (Calderwood e Mekalanos, 1988; De Lorenzo *et al.*, 1988). Entretanto, estudos de *footprinting* com DNase I demonstram que Fur protege uma região maior que a região correspondente ao *Fur-box*, de aproximadamente 31 pb. Geralmente os sítios de ligação de Fur consistem de dois ou mais *Fur-box* adjacentes ou sobrepostos, sugerindo a ligação de muitos dímeros de Fur. De fato, em alguns promotores controlados por Fur pode ocorrer a ligação de diversos dímeros, podendo estender a região do promotor envolvida em mais de 100 pb (Escolar *et al.*, 2000). O *Fur-box* pode ser interpretado, alternativamente, como seqüências palindrômicas de 9-1-9 pb, três hexâmeros repetidos, ou duas repetições invertidas sobrepostas 7-1-7 pb (Baichoo e Helmann, 2002; Lavrrar e McIntosh, 2003).

Apesar da proteína Fur, como citado anteriormente, atuar, na maioria dos casos, como um repressor positivo, alguns genes têm a sua expressão induzida na presença dela,

como os genes de *E. coli* *acnA*, *bfr*, *ftnA*, *fumA*, *fumB*, *sdhCDAB* e *sodB* (Tabela 1). Contudo, tais genes não aparentam possuir um *Fur-box*, sendo regulados indiretamente por Fur. O único gene conhecido por ser induzido por ferro através da interação direta com Fur é o gene da ferritina (*pfr*) de *Helicobacter pylori* (Delany *et al.*, 2001).

Em *E. coli*, o tipo de regulação indireta por Fur ocorre via RyhB, um pequeno RNA de 90 nucleotídeos, codificado pelo gene *ryhB*. RyhB promove a degradação dos níveis de mRNA de genes que são positivamente regulados por Fur (mencionados acima). Entretanto, na presença de Fe^{2+} , Fur reprime o gene *ryhB*, ativando, indiretamente, a transcrição daqueles genes cujos mRNAs eram degradados por RyhB (Massé e Gottesman, 2002; Massé *et al.*, 2005). Assim, essa ativação é devida à repressão de um repressor por Fur. A regulação positiva indireta por Fur pode ser conservada em outras espécies, pois sequências similares ao RyhB foram descritas para *Shigella flexneri* e *Vibrio cholerae* (Davis *et al.*, 2005; Oglesby *et al.*, 2005), e pode, também, ser encontrada nos genomas de *Salmonella* e *Yersinia* por pesquisas no BLAST. Contudo, rizóbios não possuem sequências *ryhB-like*, e, nessas bactérias, Fur não desempenha papel de um repressor global.

Outro exemplo de regulação indireta por Fur foi descrito para dois reguladores *AraC-like*, NGO0025 e NGO2115, em *Neisseria gonorrhoeae* (Ducey *et al.*, 2005). Além de controlar o metabolismo de carbono e a síntese de proteína, os reguladores *AraC-like* estão envolvidos na regulação de fatores de virulência e resposta a estresses ambientais (Gallegos *et al.*, 1997). Na região promotora dos genes que codificam essas duas proteínas foram encontradas sequências *Fur-box*, sendo esses genes desreprimidos em baixa concentração de ferro. Nessa condição, pode haver a ativação de uma cascata regulatória, onde alguns efeitos de Fur são indiretos (Ducey *et al.*, 2005).

Tabela 1: Genes regulados pela proteína Fur em *Escherichia coli* K12. Retirada de Andrews *et al.*, 2003.

<i>Gene</i>	<i>Função</i>	+/-	<i>Referência</i>
<i>acnA</i>	Aconitase, [Fe S] proteína	+	Gruer e Guest, 1994
<i>bfd</i>	Liberção de ferro da Bfr?	-	Quail <i>et al.</i> , 1996
<i>bfr</i>	Armazenamento de ferro	+	Massé e Gottesman, 2002
<i>cir</i>	Internalização de dihidroxibenzoato férrico	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>cyoA</i>	Subunidade da oxidase respiratória terminal	-	Stoljiljkovic <i>et al.</i> , 1994
<i>entABCDE</i>	Biossíntese da enterobactina	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>entS</i>	Exportação de enterobactina	-	Furrer <i>et al.</i> , 2002
<i>exbBC</i>	Transporte de sideróforo e vitamina B ₁₂	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>fecABCDE</i>	Transporte de dicitrato férrico	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>fepA</i>	Transporte de ferro-enterobactina	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>fepBCDEG</i>	Transporte de ferro-enterobactina	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>fes</i>	Utilização de ferro-enterobactina	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>fhuABCD</i>	Internalização de hidroxamato férrico	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>fhuE</i>	Internalização do <i>ferric coprogen rhodotorulate</i>	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>fhuF</i>	Utilização de ferrioxamina	-	Hantke, 2002
<i>fiu</i>	Internalização da serina dihidroxibenzoil	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>flbB</i>	Motilidade	-	Stoljiljkovic <i>et al.</i> , 1994
<i>fnA</i>	Armazenamento de ferro	+	Abdul-Tehrani <i>et al.</i> , 1999
<i>fumA</i>	Fumarase aeróbica, [Fe S] proteína	+	Park e Gunsalus, 1995
<i>fumB</i>	Fumarase anaeróbica, [Fe S] proteína	+	Tseng, 1997
<i>fumC</i>	Fumarase sem [Fe S]	+	Park e Gunsalus, 1995
<i>fur</i>	Regulador da internalização do ferro	-	De Lorenzo <i>et al.</i> , 1988
<i>nohA</i>	Recombinase de fago	-	Vassinova e Kozyruv, 2000
<i>nrdHIEF</i>	Deoxirribonucleotídeo redutase 2	-	Vassinova e Kozyruv, 2000
<i>orf78</i>	Desconhecido	-	Vassinova e Kozyruv, 2000
<i>gpmA</i>	Glicólise	-	Vassinova e Kozyruv, 2000
<i>metH</i>	Biossíntese da metionina	-	Stoljiljkovic <i>et al.</i> , 1994
<i>nohB</i>	Função de fago	-	Stoljiljkovic <i>et al.</i> , 1994
<i>purR</i>	Regulação do regulon da purina	-	Stoljiljkovic <i>et al.</i> , 1994
<i>ryhB</i>	Pequeno RNA regulador	-	Massé e Gottesman, 2002
<i>sdhCDAB</i>	Ciclo do TCA	+	Park <i>et al.</i> , 1995
<i>sodA</i>	Manganês superóxido dismutase	-	Fee, 1991
<i>sodB</i>	Ferro superóxido dismutase	+	Fee, 1991
<i>tonB</i>	Transportador de sideróforo e vitamina B ₁₂	-	Litwin e Calderwood, 1993
<i>ygaC</i>	Desconhecido	-	Vassinova e Kozyruv, 2000
<i>yhhY</i>	Desconhecido	+	Vassinova e Kozyruv, 2000

“+/-” indicam indução (+) ou repressão (-) pelo complexo Fe²⁺ - Fur

1.3.3. Os genes regulados pela proteína Fur

O efeito de Fur na expressão gênica global tem sido examinado em numerosas espécies de bactérias. Exemplos são *Neisseria gonorrhoeae* (Ducey *et al.*, 2005), *N. meningitidis* (Grifantini *et al.*, 2004), *Campylobacter jejuni* (Palyada *et al.*, 2004), *Shigella flexneri* (Oglesby *et al.*, 2005), *E. coli* (Massé *et al.*, 2005) e *B. subtilis*

A inativação do gene *fur* em *E. coli* leva à incapacidade de multiplicação em fontes de carbono não fermentáveis (Hantke, 1987), o que sugere um defeito na respiração. Em *Salmonella*, a inativação de *fur* aumenta sensivelmente a acidez, sugerindo que Fur possui um papel importante na resposta ao estresse ácido (Foster e Hall, 1992). Além disso, mutantes *fur* de *E. coli* são mais sensíveis ao estresse redox ferro-induzido (Touati *et al.*, 1995), presumivelmente devido ao aumento dos níveis de ferro citosólico livre.

1.3.4. O controle do gene *fur* e a relação com o estresse oxidativo

O gene *fur* de *E. coli* encontra-se à jusante no operon bicistrônico *fldA-fur*. Esse arranjo é encontrado em outras bactérias, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Yersinia pestis* (Zheng *et al.*, 1999). O gene *fldA* é essencial e codifica flavodoxina, uma proteína contendo flavina envolvida na química redox. É possível que a flavodoxina tenha um papel importante na manutenção do ferro citosólico livre em um estado reduzido, podendo ser importante para o fornecimento de Fe²⁺ para a proteína Fur.

Como já mencionado, o ferro é um elemento indispensável para a vida das células, sendo que muitas enzimas metabólicas têm o ferro como um cofator em seus sítios ativos. Por outro lado, através da reação de Fenton, o ferro também promove a formação de radicais hidroxil, que indiscriminadamente danificam todo componente celular. Por isso, existe uma íntima relação entre o metabolismo de ferro e o estresse oxidativo.

O peróxido de hidrogênio ativa o fator de transcrição OxyR através da oxidação de duas cisteínas e formação de uma ligação dissulfeto intramolecular (Zheng *et al.*, 1998). A ativação desse fator induz a transcrição de diversos genes antioxidantes (Zheng *et al.*, 1999). Componentes geradores de superóxido, como o paraquat, ativam outro fator transcricional chamado SoxR (Gaudu *et al.*, 1997 ; Hidalgo *et al.*, 1997). Esse induz a

expressão de um segundo fator de transcrição SoxS, que ativa a transcrição de diversos genes também antioxidantes (Zheng *et al.*, 1999).

O operon *fldA-fur* de *E. coli* é induzido (10 vezes) pelo sistema SoxR em resposta ao estresse redox mediado por superóxido (Zheng *et al.*, 1999). Além disso, o próprio promotor do gene *fur* é induzido cerca de 10 vezes por OxyR, em resposta ao estresse redox mediado por H₂O₂. Entretanto, parece que o estresse redox aumenta os níveis de Fur em apenas duas vezes (de 5000 para 10000 cópias por célula). Essa regulação revela uma interessante ligação entre a manutenção do estresse redox e a homeostase do ferro nessa bactéria (Andrews *et al.*, 2003).

O aumento dos níveis de Fur durante o estresse redox pode ser esperado por aumentar a capacidade de Fe²⁺ ligante do citosol, reprimindo o transporte de ferro e induzindo sistemas de armazenagem de ferro. Esses efeitos podem reduzir os níveis de ferro livre no citosol durante o estresse oxidativo que poderia, por sua vez, ajudar a conter a toxicidade ferro-induzida (Andrews *et al.*, 2003).

O gene *fur* de *E. coli* é também fracamente auto-regulado via um Fur-*box* localizado na região intergênica *fldA-fur* (de Lorenzo *et al.*, 1988). Além disso, tem sido relatado que a expressão de *fur* está sob o controle de uma proteína receptora de AMP cíclico (Crp). Contudo, não ficou claro se a fusão *fur-lacZ* utilizada no estudo da regulação de Crp não incluía a verdadeira região promotora de *fur* (Zheng *et al.*, 1999). Por isso, o efeito da expressão de *fur* necessita ser re-analisado.

1.3.5. O gene *fur* e sua proteína correspondente no gênero *Bradyrhizobium* e bactérias relacionadas

O gene *fur* foi identificado em diversas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo *B. japonicum* (Hamza *et al.*, 1999) e *Rhizobium leguminosarum*, através da complementação funcional de mutantes de *E. coli* (De Luca *et al.*, 1998). Fur está envolvida no controle do metabolismo do ferro em *B. japonicum* (Hamza *et al.*, 1999, 2000), mas parece desempenhar um papel secundário em *R. leguminosarum* (Wexler *et al.*, 2003). Homólogos da proteína Fur são encontrados em outros genomas taxonomicamente relacionados com o grupo das α -proteobactérias.

Proteínas Fur-like são amplamente distribuídas entre rizóbios, mas caracterizações dessas proteínas estão restritas a poucas espécies. Com relação a mutantes, Fur parece essencial tanto para bactérias patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitidis*, como para rizóbios simbióticos, como *R. leguminosarum* (De Luca *et al.*, 1998). Esses achados contrastam com a situação de, por exemplo, *B. japonicum* e *Sinorhizobium meliloti*, em que estirpes de mutantes *fur* viáveis foram obtidas (Hamza *et al.*, 1999; Chao *et al.*, 2004). Benson e colaboradores (2004) selecionaram mutantes *fur* de *B. japonicum* através de resistência a manganês e demonstraram que esses são incapazes de formarem nódulos em simbiose com a soja.

O conhecimento sobre Fur-boxes em rizóbios é restrito. A ligação de Fur de *B. japonicum* à seqüência consenso Fur foi demonstrada por *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA, Hamza *et al.*, 1999). Ironicamente, o único sítio real de ligação de Fur de *B. japonicum* que foi provado experimentalmente provém de um motivo Fur-box atípico na região promotora do gene *irr*, que será visto posteriormente (Friedman e O'Brian, 2003). Uma proteína Fur mutante de *B. japonicum*, que perdeu o sítio de ligação ao ferro, foi

capaz de se ligar ao DNA de uma maneira metal-responsiva (Friedman e O'Brian, 2004), sugerindo que as funções dos sítios de ligação ao metal não podem ser extrapoladas para as proteínas Fur de todas as bactérias.

1.4. Outros genes metal dependentes

Fur é o membro fundador da família de reguladores que inclui Zur (Gaballa e Helmann, 1998; Patzer e Hantke, 1998), PerR (Bsat *et al.*, 1998), Mur (Chao *et al.*, 2004; Diaz-Mireles *et al.*, 2004; Platero *et al.*, 2004) e Irr (Hamza *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 1999). Essas proteínas, chamadas Fur-like, diferem em função e possuem diferentes sítios de ligação ao DNA, mas estão todas envolvidas no controle da expressão gênica metal-dependente.

1.4.1. Zur

Gaballa e Helmann (1998) descreveram a proteína Zur em *Bacillus subtilis*. Essa proteína é responsável pela repressão zinco-específica de dois operons implicados na internalização do zinco, por isso a denominação de Zur. Um desses operons contém o gene *ycdH*, que codifica um transportador ABC, necessário para a multiplicação bacteriana em uma condição limitante de zinco, enquanto o outro contém o gene *yciC*, que codifica uma proteína de membrana de função desconhecida.

A proteína Zur também foi descrita em *E. coli* (Patzner e Hantke, 1998; Patzer e Hantke, 2000). Ela apresenta 27% de identidade de sequência com Fur. Entretanto, a proteína Zur de *E. coli* se liga a zinco ao invés de ferro, regulando a entrada desse metal na célula pelo sistema ZnuABC. A síntese de transportadores de zinco em *E. coli*, codificada pelo *cluster* de genes *znuABC*, é regulada em resposta à concentração intracelular de zinco

pelo produto do gene *zur*. A inativação do gene *zur* demonstrou que a proteína Zur atua como um repressor quando ligada à Zn^{2+} . Nenhuma evidência de auto-regulação de Zur foi encontrada.

1.4.2. PerA

Já a proteína PerA, outro membro da família Fur, atua como um repressor metal ligante, responsivo tanto a ferro como manganês. Foi descrita em *B. subtilis* controlando a transcrição de genes que codificam proteínas de resistência ao estresse oxidativo, como uma catalase, e genes que codificam proteínas ferritinas de armazenamento de ferro (Bsat *et al.*, 1998). Além disso, PerR é responsiva à peróxido de hidrogênio, uma propriedade que a torna funcionalmente análoga a OxyR, o regulador de estresse peróxido mais bem caracterizado em *E. coli*.

1.4.3. Mur

O regulador de internalização de manganês (Mur) é outro regulador representativo da família Fur, que foi formalmente descrito como uma proteína genuína Fur com base na sua seqüência de aminoácidos. Embora essa proteína *Fur-like* se ligue a uma seqüência canônica *Fur-box* de 19 pb (Escolar *et al.*, 1999; Wexler *et al.*, 2003) ela não está envolvida no metabolismo do ferro, mas sim na internalização de manganês em *R. leguminosarum* e *S. meliloti* (Chao *et al.*, 2004; Diaz-Mireles *et al.*, 2004; Platero *et al.*, 2004).

Chao e colaboradores (2004) apresentaram dados de microarranjo em *S. meliloti* demonstrando que esse organismo possui um número menor de genes sob o controle de Fur, quando comparado com resultados de análises de genes ferro-responsivos em *E. coli*

(McHugh *et al.*, 2003) e *N. meningitidis* (Grifantini *et al.*, 2004). Entre os genes presumivelmente reprimidos por Fur, apenas aqueles do operon *sitABCD* adjacentes ao *fur* estão envolvidos na internalização do metal. Nenhum dos sistemas de internalização de *S. meliloti* está positivamente ativado no mutante *fur*. Após uma procura no genoma total por regiões de ligação da proteína Fur, um motivo (GCAAATGCTTCTCATTGTC) com moderada similaridade ao *Fur-box* foi detectado em frente ao operon *sitABCD*, mas não em frente de outros genes positivamente regulados (Chao *et al.*, 2004). Entretanto, o operon *sitABCD* de *S. meliloti* foi renomeado para operon *mntABCD* (Platero *et al.*, 2004) pelo fato de que os homólogos a SitABCD em *E. coli*, *S. flexneri* e *Salmonella enterica* atuavam como transportadores de Fe²⁺ e Mn²⁺ (Boyer *et al.*, 2002; Runyen-Janecky e Payne, 2002; Sabri *et al.*, 2006), e a afinidade de SitABCD de *S. entérica* por Mn²⁺ é maior do que por Fe²⁺ (Kehres *et al.*, 2002). Consequentemente, a proteína *Fur-like* foi renomeada para Mur, uma vez que *R. leguminosarum* e *S. meliloti* apresentavam a transcrição do operon *mnt (sit)* reprimida em resposta a Mn²⁺ (Wexler *et al.*, 2003; Chao *et al.*, 2004; Diaz-Mireles *et al.*, 2004). Homólogas de Mur podem existir em outros rizóbios, mas são difíceis de distinguir da proteína Fur genuína, devido à alta similaridade de seqüência. Assim, é possível que proteínas Fur possam, eventualmente, revelar-se como homólogas a Mur. A proteína Mur de *Rhizobium leguminosarum* tem a habilidade de responder não apenas ao manganês, mas também ao ferro, quando expressada em uma linhagem mutante de *E. coli* para o gene *fur* (Rudolph *et al.*, 2006).

O sítio de ligação de Mur em *R. leguminosarum* foi determinado por Diaz-Mireles *et al.* (2004, 2005). Embora Mur seja uma homóloga de Fur, sua seqüência de ligação ao DNA difere da convencional seqüência *Fur-box* (GATAATGATAATCATTATC). Mur se liga a dois motivos similares denominados MRS1 e MRS2 (Seqüências Mur-responsivas).

Mais recentemente, foi demonstrado que a proteína Mur de *R. leguminosarum* se liga ao seu alvo como um ou dois homodímeros (Rudolph *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que a interação entre Mur e MRS2 ocorre não apenas na presença de Mn^{2+} , mas também na presença de Fe^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} (Rudolph *et al.*, 2006). Interessantemente, a proteína Mur de *R. leguminosarum* liga-se também em um Fur-*box* atípico na região promotora do gene *irr* em *B. japonicum* (Bellini e Hemmings, 2006).

1.4.4. Irr

O regulador responsivo a ferro Irr pertence à família de reguladores de internalização de ferro. Em contraste com Fur, que é encontrada em todas as bactérias Gram-negativas, as proteínas Irr são restritas a membros de α -proteobactérias. Homólogas de Irr existem em todos os rizóbios e bactérias relacionadas, incluindo espécies patogênicas de *Brucella*. Irr foi originalmente descoberta em *B. japonicum* e homólogas relacionadas estão presentes em *Bradyrhizobium sp.* BTAi1, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Xanthobacter autotrophicus* e *Magnetospirillum magnetotacticum* (revisado em Rudolph *et al.*, 2006). Inicialmente, a proteína Irr de *B. japonicum* foi descrita como estando envolvida no controle do transporte de ferro e para reprimir *hemB*, o gene que codifica uma ácido δ -aminolevulínico desidratase, em células com condições limitantes de ferro (Hamza *et al.*, 1998). Em *B. japonicum*, um aumento na suplementação de ferro leva a desrepressão de *hemB*, permitindo a síntese de heme. Irr é uma proteína condicionalmente estável, que, em células com ferro, é degradada pela ligação de heme férrico (oxidado) em um motivo regulador de heme (HRM). Um segundo sítio, que é conservado em homólogas a Irr, compreende três resíduos de histidina (H117-H119 da Irr de *B. japonicum*), e se liga a heme ferroso (reduzido). Uma degradação

eficiente de Irr em células com ferro requer a ligação de heme em ambos sítios (Qi *et al.*, 1999; Yanh *et al.*, 2005). Dados recentes indicam que Irr de *B. japonicum* também responde ao estresse oxidativo de uma maneira ferro-dependente. Especificamente, heme cataliza a oxidação de Irr, que, então, aciona sua degradação por um caminho proteolítico ainda indefinido (Yang *et al.*, 2006a). Além da molécula efetora heme, Irr interage diretamente com a enzima ferroquelatase (HemH), envolvida na biossíntese do heme. Na presença de ferro, Irr é inativado pela ligação do HemH, que inicia um processo de degradação heme-dependente. Quando o ferro é limitado ocorre a dissociação do HemH e Irr, que, então, pode atuar como regulador nos seus genes alvo (Qi e O'Brian, 2002; Yang *et al.*, 2005). O controle ferro-dependente de cinco genes de receptores de ferro é afetado em mutantes de *B. japonicum* que perdaram tanto *irr* como *hemA* e *hemH*, os genes da ácido δ -aminolevulínico sintase e ferroquelatase, respectivamente. Assim, enquanto em muitas outras bactérias a homeostase do ferro é mediada por Fur, que regula a expressão gênica sob ligação direta ao ferro, parece que em *B. japonicum* esse processo depende, também, da biossíntese do heme, assim como de Irr (Yang *et al.*, 2006b).

Além do controle pós-transcricional, o gene *irr* de *B. japonicum* encontra-se sob o controle transcricional de Fur. Friedman e O'Brian (2003) demonstraram que a proteína Fur de *B. japonicum* se liga ao promotor do gene *irr* com alta afinidade, apesar da ausência de um Fur-*box* consenso. Um novo elemento Fur-ligante foi identificado na região promotora de *irr*, que os autores interpretaram como motivos de DNA repetidos diretamente. Fur tem demonstrado se ligar nessa região, sugerindo que o Fur-*box* originalmente proposto (Calderwood e Mekalanos, 1988; De Lorenzo *et al.*, 1988) pode não representar a seqüência alvo geral para a proteína Fur em todas as bactérias (Hamza *et al.*, 2000; Friedman e O'Brian, 2003).

Em *R. leguminosarum*, diferentemente de *B. japonicum*, a expressão de *irr* não é regulada pela proteína Fur. Consistente com isso, a proteína Fur purificada não se liga *in vitro* na região promotora de *irr* de *R. leguminosarum* (Wexler *et al.*, 2003). O envolvimento de Irr de *R. leguminosarum* na biossíntese de heme foi observado no nível de *hemA* mas não de *hemB* (Todd *et al.*, 2006). Com exceção de *B. japonicum* e *Rhodopseudomonas palustris*, as proteínas Irr de *Xhantobacter autotrophicus*, *Nitrobacter* sp, *Magnetospirillum magnetotacticum* e *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 possuem um domínio HRM, sugerindo que a instabilidade heme-dependente provavelmente não seja restrita à Irr de *B. japonicum* (Rudolph *et al.*, 2006).

Como os estudos de reguladores de ferro foram, por muitos anos, focados na proteína Fur, análises mais detalhadas da regulação mediada por Irr têm emergido recentemente. A maior parte do conhecimento sobre este regulador se originou de trabalhos com *B. japonicum* e, mais recentemente, *R. leguminosarum* e *Brucella abortus* (Rudolph *et al.*, 2006). Igualmente ao regulador Fur, Irr de *B. abortus* é uma proteína dimérica (Pohl *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2005), e os genes *irr* desse organismo são negativamente auto-regulados (Martinez *et al.*, 2005). Dados recentes de microarranjo com *B. japonicum* indicaram que a função regulatória de Irr não é restrita a biossíntese de heme. Isso demonstra que Irr, além de Fur e RirA, é outro regulador que merece o termo “global”. Muitos genes que são regulados em *E. coli* por Fur ou RyhB estão sob o controle de Irr em *B. japonicum* (Rudolph *et al.*, 2006).

O sítio de ligação da proteína Irr é uma seqüência palindrômica imperfeita, denominada de ICE (para elemento que controla ferro), primeiramente descrita por Nienaber e colaboradores (2001). ICE foi demonstrada como sendo essencial para a regulação dos genes *hmuR* e *hmuT*, que codificam componentes do sistema de

internalização de heme em *B. japonicum*. Os motivos de ICE estão localizados perto ou dentro de promotores de genes ferro-regulados. Dependendo da localização, eles estarão envolvidos no controle positivo ou negativo dos genes associados com a regulação do ferro, cujos produtos estão envolvidos na internalização ou armazenamento de ferro, metabolismo energético, ciclo do TCA e resposta ao estresse (Rudolph *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006b). Os motivos ICE são conservados em Rhizobiales and Rhodobacterales, sugerindo que a regulação ICE-dependente, através da proteína Irr, seja um mecanismo largamente utilizado para a homeostase do ferro celular, não apenas em *B. japonicum*, mas, possivelmente, também em todas α -proteobactérias que codificam proteínas homólogas a Irr (Rudolph *et al.*, 2006).

O “regulon” Irr de *B. japonicum* compreende cerca de 80 genes, entre eles, *hemB*, genes para ferricromo e sistema de internalização de heme [*fegA* (*bll4920*), *fcuA*, *hmuTUV*, *hmuR-exbBD-tonB*], bacterioferritina (*bll6680*), uma proteína de ligação à membrana rubreritina-like, possivelmente envolvida na resposta ao estresse oxidativo (*blr7895*), fumarases A and C (*fumA*, *fumC*) e o 3-isopropilmalato desidratase (*leuC*) (Rudolph *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006b). Originalmente, Fur foi relatada como estando envolvida na regulação do gene *hemA* de *B. japonicum* (Hamza *et al.*, 2000). Ainda, a expressão de *hemA* (e *hemB*) é aumentada também no mutante *irr* quando multiplicado em um meio com limitação de ferro (Yang *et al.*, 2006b), concordando com a observação feita por Todd e colaboradores (2006) em *R. leguminosarum*.

A dupla função de Irr como um ativador e como um repressor tem sido analisada com detalhes para os promotores dos genes *bll6680*, *blr7895* e *hmuR* de *B. japonicum* (Rudolph *et al.*, 2006). Sítios de início de transcrição desses genes foram determinados e os motivos ICE foram encontrados à jusante ou sobrepostos aos elementos promotores -

35/-10 de *hmuR*, *bll6680* e *blr7895*. Dependendo da localização de ICE, os genes são ativados (*hmuR*) ou reprimidos (*bll6680* e *blr7895*) sob baixas condições de ferro. Outro exemplo do papel regulatório duplo de Irr é o da regulação de dois genes A e C da fumarase, cujos produtos pertencem ao ciclo do TCA. Tem sido demonstrado que Irr interage com os motivos ICE para ambos genes (Yang *et al.*, 2006b). A fumarase A pertence à fumarase classe I, sendo uma proteína ferro-enxofre. O gene *fumA* é desreprimido sob condições de alta concentração de ferro. A fumarase C, uma fumarase classe II não possui ferro, e a transcrição de *fumC* é ativada sob condições de baixa concentração de ferro. Assim, *B. japonicum* possui duas fumarases que são sintetizadas sob diferentes condições. Dados de microarranjo indicaram que cerca de 80 genes são regulados por Irr. Destes, apenas 20 são reprimidos sob condições de limitação de ferro, indicando que Irr é, predominantemente, um ativador ferro-responsivo, em vez de um repressor (Rudolph *et al.*, 2006).

Outra proteína Irr de rizóbio que vem sendo analisada com mais detalhe é IrrA de *R. leguminosarum* (RL0115) (Tood *et al.*, 2006). Genes-alvo previstos são *fumA*, *hemA1*, *rirA*, *rrp1* (que codifica um receptor ferro-sideróforo), o operon *sufS2BCDS1XA*, *irpA*, *RL0400* (que codifica uma possível proteína “Fe-S scaffold”) e *RL0263*, um ortólogo de *B. japonicum* *blr7895*. Na ausência de ferro, IrrA reprime muitos desses genes, incluindo *fumA*, consistente com os dados obtidos com Irr de *B. japonicum*. Uma exceção é o gene *rrp1*, que é ativado sob baixas concentrações de ferro. Interessantemente, os genes *rirA* *like*, *sufS2BCDS1XA* e *rrp1* são parcialmente reprimidos por IrrA (em baixas concentrações de ferro) e por RirA (em altas concentrações de ferro). Essa dupla regulação está de acordo com a presença dos motivos IRO (operadores responsivos à ferro) e ICE nas regiões promotoras desses genes (Tood *et al.*, 2006).

B. japonicum, *Rhodopseudomonas palustris* e *R. leguminosarum* possuem, cada uma, uma segunda cópia da proteína Irr, codificada pelos genes *blr1216*, *RPA2339* e *pRL110146*, respectivamente. *blr1216* de *B. japonicum* não parece contribuir para a regulação por ferro dos genes-alvo de Irr, tais como *hmuR*, *bll6680* e *blr7895* (Rudolph *et al.*, 2006). Entretanto, parece que não se pode excluir formalmente a possibilidade de que *blr1216* regule outros promotores em *B. japonicum*, talvez em resposta a outros cátions divalentes.

1.4.5. O regulador RirA

O regulador de ferro RirA em rizóbios foi originalmente descrito para *R. leguminosarum* por Todd e colaboradores (2002). RirA não possui similaridade de seqüência significativa com os membros da família Fur, mas pertence à família Rrf2 de reguladores transcricionais. Essa família inclui o regulador Rrf2 da síntese do citocromo em *Desulfovibrio vulgaris* (Keon *et al.*, 1997), IscR de *E. coli*, um repressor de genes que codificam a proteína de montagem do grupamento Fe-S (Schwartz *et al.*, 2001), e NsrR de *Nitrosomonas europaea*, um repressor transcricional nitrito-sensitivo (Beaumont *et al.*, 2004). Rrf2, NsrR e RirA possuem um domínio de ligação ao DNA hélice-volta-hélice (Beaumont *et al.*, 2004). Há indicações de que RirA, assim como IscR, se ligue ao DNA e responda à disponibilidade de grupamentos Fe-S, reprimindo, eventualmente, seus genes ligantes (Todd *et al.*, 2006). Homólogas de RirA de *R. leguminosarum* (acesso n.º CAC35510) são encontradas em *R. etli* (YP_468276; 95% de identidade), *S. meliloti* (CAC45302; 84%), *Agrobacterium tumefaciens* (AAL41224; 88%), *Mesorhizobium loti* (BAB48587; 77%), o patógeno de mamíferos *Brucella melitensis* (AAL53949; 79%) e *Bartonella henselae* (CAF27391; 73%) (revisado em Rudolph *et al.*, 2006).

Interessantemente, nenhum homólogo de RirA existe em *B. japonicum* e *Rhodopseudomonas palustris* (Rudolph *et al.*, 2006). Ainda, proteínas com baixa similaridade (~ 40% de identidade) com RirA existem em diversas outras bactérias, sugerindo que reguladores transcricionais similares a RirA são comuns e não específicos de α -proteobactérias (Tood *et al.*, 2002).

Apesar de sua larga distribuição, o papel de RirA na regulação do ferro tem sido avaliado até agora somente em *R. leguminosarum* e *S. melioli*. Dados recentes de eletroforese em gel bi-dimencional e microarranjo demonstraram que a proteína RirA de *R. leguminosarum* e *S. melioli* podem atuar tanto como repressor quanto como ativador (Chao *et al.*, 2005; Tood *et al.*, 2005).

A transcrição de *rirA* é diminuída sob condições de carência de ferro, como demonstrado em *S. melioli* e *R. leguminosarum* (Tood *et al.*, 2002; Viguiet *et al.*, 2005). Além disso, *rirA* de *R. leguminosarum* é negativamente auto-regulado sob condições com ferro (Tood *et al.*, 2002) e reprimido pelo regulador que responde ao ferro, Irr, em condições sem ferro (Tood *et al.*, 2006). *S. melioli* possui uma proteína homóloga a Irr, sendo que o mesmo tipo de regulação pode ocorrer neste organismo (Rudolph *et al.*, 2006).

Em *R. leguminosarum*, genes para síntese de vicibactina, regulação e internalização desse sideróforo (*vbsC*, *rpoI* e dois genes *fhuA*, respectivamente) são controlados por RirA. Há indicações que esses genes são reprimidos em resposta ao ferro pela ligação de RirA em seqüências conservadas, os operadores responsivos ao ferro (IROs), que estão associados com promotores dos respectivos genes (Yeoman *et al.*, 2004). IROs adicionais estão localizados à montante do operon *suf* e *rrpI*, genes receptores de ferro-sideróforo. Outras seqüências IROs estão localizadas no promotor *rirA*, apresentando o motivo de ligação para Irr, ICE (Rudolph *et al.*, 2006).

Recentemente, o “regulon” RirA de *R. leguminosarum* foi expandido com ajuda de eletroforese em gel bi-dimencional (Tood *et al.*, 2005). Em condições com ferro, 97 proteínas foram induzidas e 17 reprimidas em um mutante *rirA*, quando comparado com a linhagem selvagem. Entre as proteínas mais abundantes estão: os produtos do operon *sufS2BCDSIXA*, provavelmente relacionado à síntese dos grupamentos Fe-S; Rrp1 (RL2713), um receptor ferro-sideróforo com aproximadamente 35% de identidade com o transportador coronebactina ABC Irp6A de *Corynebacterium diphtheriae* (Qian *et al.*, 2002); e Rrp12 (pRL120713), uma proteína de ligação periplásmica e um transportador ABC. Proteínas presentes em baixos níveis na ausência de RirA e provavelmente sob controle positivo do regulador foram: uma enzima *GatB-like*, envolvida na modificação do tRNA, uma proteína (RL1019) que pode conferir resistência à bacteriocina microcina B17, e três proteínas de ligação periplásmicas de transportadores ABC, Rip2 (pRL110400), Rip4 (RL3533) e Rip5 (pRL120351) (Todd *et al.*, 2005).

Genes de *S. melioli* RirA-regulados e ferro responsivos foram recentemente identificados (Chao *et al.*, 2005). Quarenta e cinco genes foram encontrados como sendo induzidos no mutante *rirA* sob condições de limitação de ferro, indicando que RirA normalmente os reprime. Entre eles estão os genes de transporte de ferro ou heme *hmuPSTU* e *shmR*, os genes *fixN3*, *fixP3* e *qxtAB* com funções no metabolismo de energia e *exoY* e *exoN*, envolvidos na produção de exopolissacarídeos. De acordo com os achados de Todd e colaboradores (2005), os genes *sufASDCB* envolvidos na formação do grupamento Fe-S estiveram também presentes entre os genes de *S. melioli* RirA-regulados. Os genes para síntese da rizobactina 1021, que foram assumidos como sendo regulados por Fur (Lynch *et al.*, 2001; Chao *et al.*, 2004), também estão sob o controle de RirA (Viguiier *et al.*, 2005). Apenas quatro genes foram reprimidos no mutante *rirA* sob condições de

limitação de ferro, indicando que RirA é um repressor ferro-dependente, em vez de um ativador (Rudolph *et al.*, 2006).

2. Objetivos

Em *Bradyrhizobium elkanii* não existem, até o presente, trabalhos envolvendo a proteína Fur ou o gene correspondente. Por ser utilizada como inoculante apenas no Brasil, a comunidade científica vem dando pouca atenção a essa espécie, diferentemente de *B. japonicum*, que já possui diversos sistemas caracterizados. Entretanto, estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que as duas espécies são diferentes quanto aos genes em diferentes sistemas.

Pelo acima exposto, esse trabalho teve como objetivo geral o isolamento e a caracterização do gene *fur* de *B. elkanii*, visando-se um melhor entendimento da função e dos mecanismos de regulação do sistema de resposta ao ferro nessa bactéria.

Os objetivos específicos foram:

- a) Identificar, isolar e caracterizar a seqüência do gene *fur* e suas regiões reguladoras em *B. elkanii*;
- b) Realizar análises de expressão gênica do gene *fur*;
- c) Construir mutantes nulos de *B. elkanii* para o gene *fur*, para, posteriormente, realizar ensaios de nodulação de soja com bactérias de tipo selvagem e mutante, a fim de analisar a participação do gene *fur* e dos seus genes-alvo na nodulação.

3. Material e Métodos

3.1. Descrição das bactérias e plasmídeos utilizados nesse trabalho

3.1.1. Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho foram: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, *B. elkanii* SEMIA 5019, *B. japonicum* SEMIA 5079, *B. japonicum* SEMIA 5080, *Escherichia coli* XL1-Blue, *E. coli* S17-1 e *E. coli* MC1061.

3.1.2. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados nesse trabalho foram: pGEMT-*Easy* (Promega), pUC18 (Stratagene), pMC1403 (Casadaban *et al.*, 1983) e pSUP 202 (Simon *et al.*, 1983).

3.2. Isolamento, clonagem e sequenciamento do gene *fur* de *B. elkanii* SEMIA 587

3.2.1. Extração de DNA genômico de *B. elkanii* e *B. japonicum*

Células bacterianas foram multiplicadas em meio Levedura Manitol (LM, Vicent, 1970) por sete dias a 28°C sob agitação constante de 128 rpm. As células foram lavadas em tampão TES (50 mM Tris pH 8, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl), e suspensas em salina-EDTA (150 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8). As células foram rompidas com dodecil sulfato de sódio (SDS, 20%) aquecido a 55°C. O DNA foi extraído utilizando-se clorofórmio:alcool isoamílico (24:1) e precipitado com etanol absoluto.

3.2.2. Amplificação de um fragmento de 297 pb, correspondente a uma região conservada do gene *fur*

3.2.2.1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de amplificação em cadeia (PCR)

Para a construção dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), primeiramente fez-se uma busca por seqüências de genes *fur* de bactérias que apresentaram maior grau de homologia com a seqüência do gene *fur* de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, disponíveis no Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos – NCBI-USA. As seqüências obtidas foram alinhadas através do programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e foram escolhidas duas regiões conservadas, uma para a construção do *primer fur*-direto (Figura 2A) e outra, para a construção do *primer fur*-reverso (Figura 2B). Os *primers* sintetizados foram idênticos à seqüência do gene *fur* da bactéria *B. japonicum* USDA110, correspondente às regiões 70 a 93 pb (*primer fur*-direto) e 346 a 366 pb (*primer fur*-reverso), originando um fragmento de 297 pb (Tabela 2 e Figura 2).

Os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587, *B. elkanii* SEMIA 5019, *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. japonicum* SEMIA 5080 foram utilizados como molde. As reações de amplificação (25 µL) continham 50 ng do DNA genômico, 1 U *Taq* DNA polimerase com seu tampão corresponde 1 X (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 5 mM de dNTPs e 10 pmol de cada *primer*. As amplificações foram realizadas em um termociclador Thermo Hybaid, utilizando-se um passo inicial de desnaturação de 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de: 1 min de desnaturação à 94°C, 30 segundos de anelamento a 52°C e 1 min de extensão a 72°C. Após essa etapa, foi realizada uma extensão adicional por 5 min a 72°C. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%

contendo brometo de etídeo em tampão Tris-EDTA 1X (TBE) e o gel foi fotografado sobre luz UV (Sambrook e Russel, 2001).

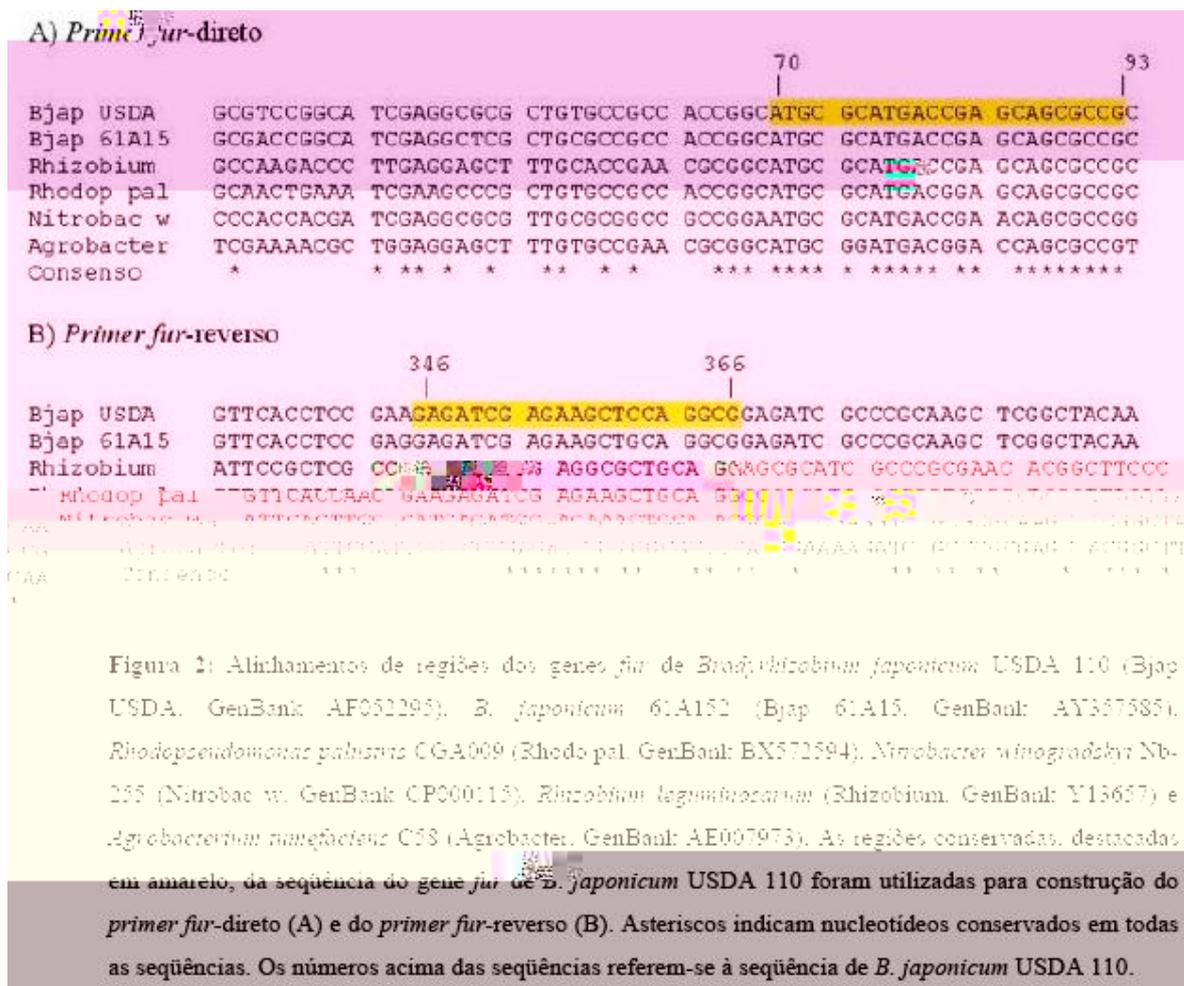


Tabela 2. *Primers* utilizados neste estudo.

<i>Primer</i>	Seqüência (5'-3')	Tamanho (pb)	T _m * (°C)
<i>fur</i> -direto	ATGCGCATGACCGAGGAGCGCCG	23	68,9
<i>fur</i> -reverso ou PGE1	CGCCTGGAGCTTCTCGATCTC	21	59,6
SFP1	CACGACACGCTACTCAACAC	20	48.7
SFP2	ACTCAACACACCACCTCGCACAGC	24	62.1

PGE: Primer Gene Específico, SFP: *SiteFinding Primer*.

* T_m: Temperatura de desnaturação teórica calculada a partir do programa Vector NTI Advance 10.3.0 (Invitrogen)

3.2.2.2. Clonagem do fragmento amplificado em pGEMT-*Easy* (Promega), extração de plasmídeo, sequenciamento e análise das seqüências

Os produtos das PCRs nas quais utilizou-se como molde os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. elkanii* SEMIA 5019 foram ligados ao vetor pGEMT-*Easy* (Promega, conforme instruções do fabricante) e as reações de ligação foram utilizadas para transformar *E. coli* XL1-Blue competentes por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). Os plasmídeos recombinantes foram identificados por PCR, utilizando-se os *primers* universais pUC/M13 direto e reverso, que se anelam no vetor pGEMT-*Easy* (Promega). O *kit* S.N.A.P.TM *MiniPrep* (Invitrogen) foi utilizado para extrair os plasmídeos recombinantes das bactérias transformantes, que continham, provavelmente, a seqüência amplificada do gene *fur* de *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. elkanii* SEMIA 5019. Posteriormente, dois destes plasmídeos (um de cada clonagem) foram submetidos ao sequenciamento com os *primers* universais pUC/M13 direto e reverso, utilizando-se o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* do Laboratório ACTGene

(Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS). Dessa forma foram obtidos os plasmídeos pGEM-*fur*587 e pGEM-*fur*5019.

Para análise das seqüências de nucleotídeos correspondentes aos fragmentos clonados nos plasmídeos pGEM-*fur*587 e pGEM-*fur*5019 foi utilizado o programa BLASTN, disponível na página do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos – NCBI-USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.3. Southern-blot genômico para comparação entre *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* e análise do número de cópias do gene *fur*

Aproximadamente 5 µg de DNA genômico das bactérias *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079 foram clivadas com as enzimas *Apa*I, *Hind*III e *Kpn*I, as quais não apresentam sítios dentro da região codificadora do gene *fur* de *B. japonicum* e nem na região amplificada do gene *fur* de *B. elkanii*. Os fragmentos de DNA resultantes das reações de clivagem foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, o gel foi fotografado e, após, os fragmentos foram transferidos para uma membrana de náilon (Sambrook e Russel, 2001). O fragmento amplificado na PCR (item 3.2.2) com o DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 foi utilizado como sonda para se identificar, por hibridização, fragmentos maiores contendo seqüências gênicas completas. Nos experimentos de hibridização foi utilizado o kit *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare).

3.4. Obtenção da região reguladora do gene *fur* de *B. elkanii*

3.4.1. Construção de uma biblioteca genômica parcial de *B. elkanii*

Visando a obtenção da região reguladora do gene *fur* de *B. elkanii*, primeiramente realizou-se um Southern-*blot* genômico com os DNAs das bactérias *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079 digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, visando a identificação de um fragmento de DNA que contivesse o gene *fur* completo. A sonda utilizada foi o fragmento amplificado por PCR (item 3.2.2) com o DNA de *B. elkanii* SEMIA 587. Com o resultado dessa hibridização foi construída uma biblioteca genômica parcial de *B. elkanii* SEMIA 587. Essa biblioteca parcial foi obtida através da clonagem de fragmentos correspondentes à banda de hibridização, os quais foram purificados em gel de agarose utilizando-se o *kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies). Os fragmentos purificados foram ligados no sítio de restrição de *EcoRI* do vetor pUC18 (previamente clivado com essa enzima), e a reação de ligação foi utilizada para transformar *E. coli* XL1-Blue competentes por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). As colônias resultantes dessa transformação foram analisadas através de hibridização de colônias, utilizando como sonda o fragmento amplificado por PCR (item 3.2.2) com o DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 e os procedimentos descritos no manual do *kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System* (GE Healthcare). Os plasmídeos das bactérias que apresentaram sinal forte na hibridização de colônias foram extraídos pelo *kit S.N.A.P.TM MiniPrep* (Invitrogen), e clivados com a enzima de restrição *EcoRI*. Posteriormente, dois desses plasmídeos foram submetidos ao seqüenciamento com os *primers* universais pUC/M13 direto e reverso, utilizando-se o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* do Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS).

3.4.2. Estratégia de *Site-Finding*-PCR

Ainda com o intuito do isolamento da região 5' do gene *fur* e da sua região promotora foi feita uma adaptação do método descrito por Tan *et al* (2005), conforme descrito na Figura 3. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 2. A Figura 4 ilustra os sítios de reconhecimento dos *primers* no gene *fur* e nos oligonucleotídeos *SiteFinders*.

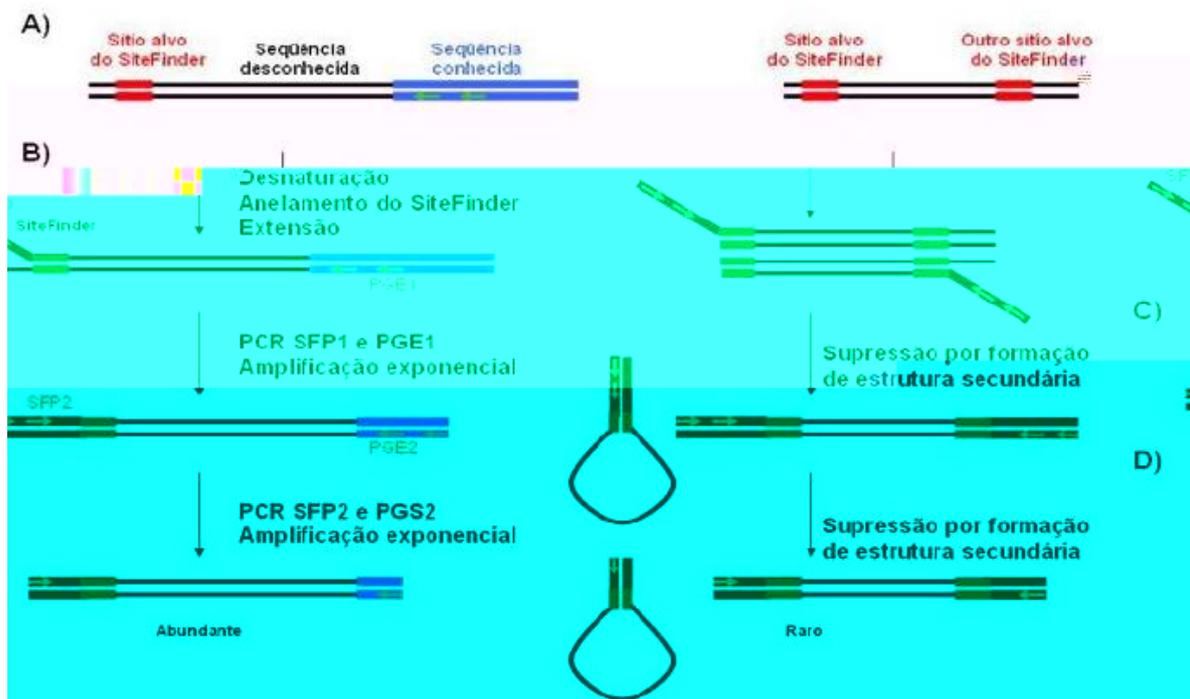


Figura 3: Adaptação da técnica de *Site-Finding*-PCR. Sequências conhecidas estão representadas em azul e seqüências desconhecidas em preto. Segmentos vermelhos mostram os sítios de reconhecimento para os oligonucleotídeos *SiteFinders*. *Primers* gene específicos (PGE) se anelam nas seqüências conhecidas, *SiteFinding primers* (SFP) se anelam nos *SiteFinders*. A) DNA molde dupla fita o... moléculas alvo (esquerda) e não alvo (direita). B) Reação de *Site-Finding*: após anelamento dos *SiteFinders* em... arxa lempetadora, uma ma e sinenzada peid raq'p'jmerase; u que gera moléculas alvo em dupla fita de dif... PG... loc... exp... am... rep...



3.4.3. *Site-Finding*: incorporação de oligonucleotídeos *SiteFinders* no genoma bacteriano

Cada mistura de PCR continha 2 µL de 10 X *High Fidelity PCR Buffer* (Invitrogen), 5 µL de solução de dNTPs 1mM (1mM de dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), 10 pmol de *SiteFinder-1* ou *SiteFinder-2* e 50 ng de DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587. O volume foi completado para 20 µL com água deionizada e um único ciclo de PCR foi feito de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Condições de reação usadas na metodologia de *SiteFinding*-PCR

Reação	Ciclo(s)	Condições Térmicas
<i>Site-Finding</i>	1	92°C (2 min), 95°C (1 min), 25°C (1 min), escalar para 68°C por 3 min, 68°C (10 min)
Primário	1	94°C (1min)
	30	95°C (10 seg), 65°C (30 seg), 68°C (6 min)
	1	72°C (5 min)
Secundário	1	94°C (1min)
	30	95°C (10 seg), 62°C (30 seg), 68°C (6 min)
	1	72°C (5 min)

3.4.2. *Nested* PCR

Para a reação primária de *Nested* PCR, foram adicionados 5 µL de mistura de *primers* [50 pmol de SFP1 e 10 pmol do *primer fur*-reverso, descrito no item 3.2.2.1 (PGE1)] diluídos em 1 X *High Fidelity PCR Buffer* acrescido MgCl₂ 2,5 mM) aos tubos do *SiteFinding* mantidos no gelo. Foram feitos 30 ciclos de PCR de acordo com a Tabela 3. Para a reação secundária, 1 µL da primeira reação foi diluído em 100 X em água deionizada, e 1 µL dessa diluição foi utilizado em uma nova PCR contendo 5 µL de 10 X *High Fidelity PCR Buffer*, 10 µL dNTPs 1 mM, 2,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 25 pmol de SFP2, 25 pmol de PGE1, 1 U *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* em volume final de 50 µL. Novamente, 30 ciclos de PCR foram realizados de acordo com os parâmetros da Tabela 3.

3.4.3. Clonagem, sequenciamento e análise dos produtos de PCR

Os produtos do *Site-Finding-PCR* foram purificados utilizando-se o *kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies) e ligados no vetor pGEMT-*Easy* (Promega). A reação de ligação foi utilizada para transformar *E. coli* XL1-Blue competentes por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). O *kit S.N.A.P.TM MiniPrep* (Invitrogen) foi utilizado para extrair os plasmídeos das bactérias transformantes. Para confirmação dos plasmídeos recombinantes foram feitas PCRs utilizando-se os *primers-fur* direto e reverso e digestão com a enzima *EcoRI*. Os clones considerados positivos (amplificação de uma banda de aproximadamente 300 pb e liberação, por clivagem, de uma banda de tamanho semelhante) foram sequenciados, utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* do Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) com os *primers* universais pUC/M13 direto e reverso. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas pelo programa BLASTN. Realizou-se o alinhamento, tanto em nível de nucleotídeos como de aminoácidos da seqüência obtida com aquelas utilizadas para construção dos *primers fur*, através do programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Para análise da região promotora foi utilizado o programa BPROM – *Prediction of Bacterial Promoters*, disponível no endereço: <http://www.softberry.com>. Este é um programa que reconhece promotores bacterianos para o fator sigma 70, com aproximadamente 80% de exatidão e especificidade.

3.5. Análise de expressão do gene *fur* de *B. elkanii*

O fragmento de 641 pb obtido pela estratégia de *Site-Finding* foi clonado no sítio de *EcoRI* do vetor pMC1403. A linhagem de *E. coli* MC1061 foi utilizada como hospedeira para transformação por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). A seleção

dos clones recombinantes foi realizada em meio Luria-Bertani (LB) contendo antibiótico ampicilina na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e X-Gal na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A atividade de β -galactosidase foi medida em células como descrito por Miller (1972). As bactérias contendo ou não o plasmídeo pMC1403 recombinante (pMC-*fur*) e uma linhagem contendo o plasmídeo pMC1403 selvagem foram multiplicadas em meio mínimo M9 (Sambrook e Russel, 2001) na presença ou ausência de ferro ($100 \mu\text{M}$ de FeCl_3 quando na presença de ferro). Toda vidraria utilizada para realizar o ensaio de expressão foi extensivamente lavada, primeiramente, com ácido clorídrico concentrado (37%) e, após, com várias lavagens com água destilada, a fim de se eliminar qualquer resquício de ferro exógeno. Depois de multiplicadas, as células foram suspensas em $800 \mu\text{L}$ de tampão Z ($60 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $40 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl , $1 \text{ mM MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $50 \text{ mM } \beta$ -mercaptoetanol). Cem microlitros da suspensão bacteriana, correspondendo a 1×10^{10} células, foram utilizados por reação. Os dados são apresentados em unidades Miller, e cada valor é a média de triplicatas que foram realizadas para cada tratamento. A absorvância de *o*-nitrophenol formado a partir do substrato ONPG (orto-nitro-fenil- β -galactopiranosídeo) pela ação da β -galactosidase foi registrada em 415 nm e normalizada pela densidade de células em OD_{595} . Para análise estatística foi utilizado o teste de análise de variância de Tukey com *P* de 0,05.

3.6. Construção de mutantes nulos de *B. elkanii* para o gene *fur*

3.6.1. Obtenção do cassete contendo os genes *aph* e *uidA*

Para a obtenção de linhagens mutantes de *B. elkanii* com o gene *fur* interrompido foi utilizado um cassete que continha o gene marcador *aph*, que confere resistência à canamicina, e o gene repórter *uidA*, que codifica a enzima β -guluronidase. Esse cassete foi

construído por William *et al.* (1993), e encontra-se clonado no plasmídeo pWM6 (cedido pelo prof. Emanuel de Souza, da UFPr).

Primeiramente, o plasmídeo pWM6 foi clivado com a enzima de restrição *SmaI*, liberando o cassete com o gene marcador *aph* e o gene repórter *uidA*. Esse fragmento, de aproximadamente 3,45 Kb, foi purificado do gel de agarose utilizando-se o *kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies).

3.6.2. Introdução do cassete ao fragmento contido no plasmídeo pGEM-*fur*

O plasmídeo pGEM-*fur*587 foi clivado com a enzima de restrição *BglI* e tratado com Klenow DNA polimerase (Promega) e dNTPs (Invitrogen) para o preenchimento das extremidades coesivas (Sambrook e Russel, 2001). O fragmento clonado no pGEM-*fur* 587 apresenta um sítio único de restrição para essa enzima, situado a 108 nucleotídeos do início desse fragmento. O cassete citado no item anterior foi inserido no sítio de *BglI* preenchido do plasmídeo pGEM-*fur*587. O *kit S.N.A.P.TM MiniPrep* (Invitrogen) foi utilizado para extrair os plasmídeos das bactérias transformantes. Os plasmídeos recombinantes, chamados pGEM-cassete-*fur*, foram identificados por clivagem com a enzima de restrição *EcoRI* (Promega).

3.6.3. Clonagem do cassete-*fur* no vetor conjugativo pSUP 202

O plasmídeo pGEM-cassete-*fur* foi clivado com *EcoRI* liberando a construção do fragmento de 297 pb interrompido pelo cassete (cassete-*fur*). Essa construção, de aproximadamente 3,75 Kb, foi purificada de gel de agarose utilizando-se o *kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies) e subclonada no sítio de *EcoRI* do vetor suicida pSUP202 (possui o gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol). A clonagem foi confirmada através da clivagem dos possíveis plasmídeos recombinantes com a enzima *EcoRI*. Após, o plasmídeo pSUP-cassete-*fur* (como foi chamado) foi inserido, via

transformação por choque térmico, na bactéria hospedeira *E. coli* S17-1, que contém os genes para transferência plasmidial via conjugação.

3.6.4. Conjugação entre *E. coli* S17-1 e *B. elkanii* SEMIA 587

E. coli S17-1 contendo o plasmídeo recombinante pSUP-cassete-*fur* e *B. elkanii* SEMIA 587 foram multiplicadas até a fase estacionária em meio LB com clorafenicol e em meio LM, respectivamente. Um mililitro de cada cultura bacteriana foi centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos separadamente. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados de células foram suspensos em 1 mL (*E. coli*) ou 0,1 mL (*B. elkanii*) de 0,9% NaCl, e misturados em uma razão de volume de 1:5. A mistura (80 µL) foi plaqueada, colocando-se apenas uma gota no centro de uma placa com meio sólido LM. Essa placa foi incubada por 3 dias a 30°C. Após esse período as células foram coletadas, suspensas em 1 mL de 0,9% NaCl e plaqueadas em meio LM contendo canamicina.

3.6.5. Análise das bactérias trans-conjugantes

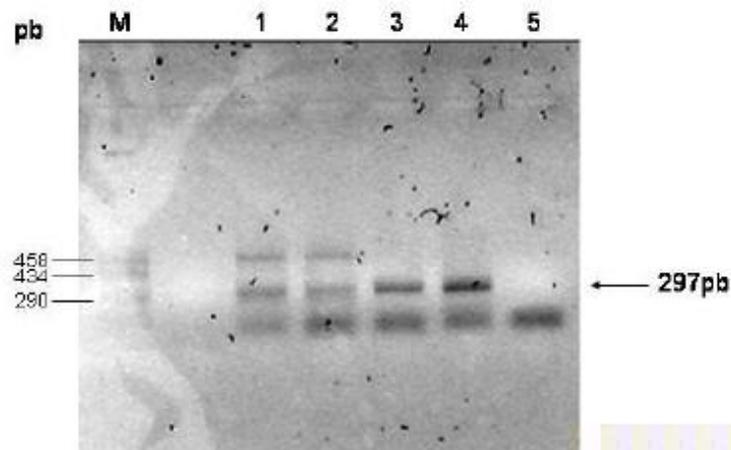
As bactérias que se multiplicaram em meio seletivo foram inoculadas em meio LM contendo canamicina. O DNA dessas bactérias foi extraído conforme descrito no item 2.1. Para confirmar que as bactérias eram os trans-conjugantes esperados, foram realizadas PCRs utilizando-se os *primers* uidAFor (5'GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG3') e uidARev (5'TGGATTCCGGCATAGTAAAAGG3'), que amplificam um fragmento de 412 pb da região codificadora do gene *uidA*, presente no cassete inserido no gene *fur*.

4. Resultados

4.1. Isolamento, clonagem e sequenciamento do gene *fur* de *B. elkanii* SEMIA

587

Com a finalidade de isolar uma região de DNA correspondente ao gene *fur* de *B. elkanii* foram desenvolvidos *primers* baseados em regiões conservadas desse gene, determinadas pela análise de ortólogos a *fur* em diferentes bactérias (Figura 2 e Tabela 2). Através da técnica de PCR, utilizando como molde o DNA gênomico das bactérias *B. elkanii* SEMIA 587, *B. elkanii* SEMIA 5019, *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. japonicum* SEMIA 5080, foram obtidos, preferencialmente, fragmentos de tamanho correspondente a 297 pb (Figura 5).

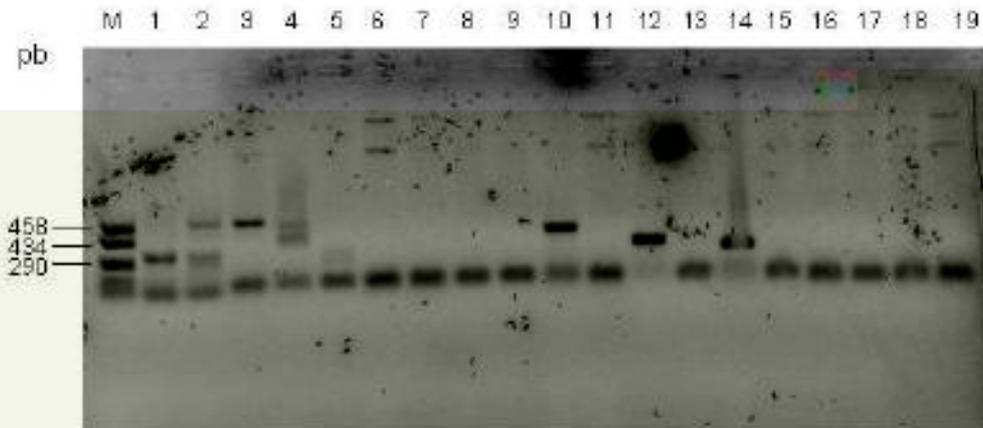


utilizando-se os *primers fur*-direto e *fur*-reverso. M - Marcador de peso molecular (pSK+ clivado com *Hae*III), 1 - Reação utilizando-se DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587, 2 - Reação utilizando-se DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 5019, 3 - Reação utilizando-se DNA genômico de *B. japonicum* SEMIA 5079, 4 - Reação utilizando-se DNA genômico de *B. japonicum* SEMIA 5080. 5 - Reação não utilizando DNA (Branco). A

Figura 5. Resultado da PCR para o gene *fur* utilizando-se os *primers fur*-direto e *fur*-reverso. M - Marcador de peso molecular (pSK+ clivado com *Hae*III), 1 - Reação utilizando-se DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587, 2 - Reação utilizando-se DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 5019, 3 - Reação utilizando-se DNA genômico de *B. japonicum* SEMIA 5079, 4 - Reação utilizando-se DNA genômico de *B. japonicum* SEMIA 5080. 5 - Reação não utilizando DNA (Branco). A seta indica a banda de 297 pb

Os fragmentos que tiveram como molde o DNA gênomico das bactérias *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. elkanii* SEMIA 5019 foram, então, clonados em pGEMT-*easy*. Dezoito e 16 colônias brancas foram obtidas para os fragmentos de *B. elkanii* 587 e *B. elkanii* 5019, respectivamente. A análise dos clones foi realizada através de PCRs, utilizando-se os *primers* universais pUC/M13 direto e reverso, que se anelam no vetor pGEMT-*Easy* (Promega) (Figura 6). O plasmídeo 12 (Figura 6A), que contém a seqüência amplificada de *B. elkanii* SEMIA 587, e o plasmídeo 14 (Figura 6B), que contém a seqüência amplificada de *B. elkanii* SEMIA 519, tiveram suas seqüências de nucleotídeos determinadas. Esse plasmídeos foram denominados pGEM-*fur*587 e pGEM-*fur*5019. As seqüências nucleotídicas obtidas foram analisadas através de programas de análise de seqüências (*i.e.* BLASTN) (Figura 7). Um alto grau de homologia tanto entre as duas seqüências, como delas com o gene *fur* de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, foi observado. Comparando-se as seqüências de nucleotídeos duas a duas observou-se que: pGEM-*fur*587 X *fur* de *B. japonicum* USDA 110 = 90% de homologia; pGEM-*fur*5019 X *fur* de *B. japonicum* USDA 110 = 89% de homologia; pGEM-*fur*587 X pGEM-*fur*5019 = 98% de homologia. Quando as seqüências foram analisadas em nível de aminoácidos (Figura 8) verificou-se um alto grau, não só de identidade, mas também de similaridade. As seqüências de aminoácidos, derivadas das seqüências de nucleotídeos dos fragmentos clonados em pGEM-*fur*587 e pGEM-*fur*5019, apresentam os seguintes graus de identidade e similaridade, comparando as seqüências duas a duas, respectivamente: pGEM-Fur587 X Fur de *B. japonicum* USDA 110 = 95% e 97%; pGEM-Fur5019 X Fur de *B. japonicum* USDA 110 = 92% e 95%; pGEM-Fur587 X pGEM-Fur5019 = 96% e 97%. Dessa forma, os dados obtidos confirmaram que os fragmentos clonados em pGEMT-*easy* correspondiam à parte do gene *fur* de *B. elkanii*.

A) *B. elkani* 587



B) *B. elkani* 5019

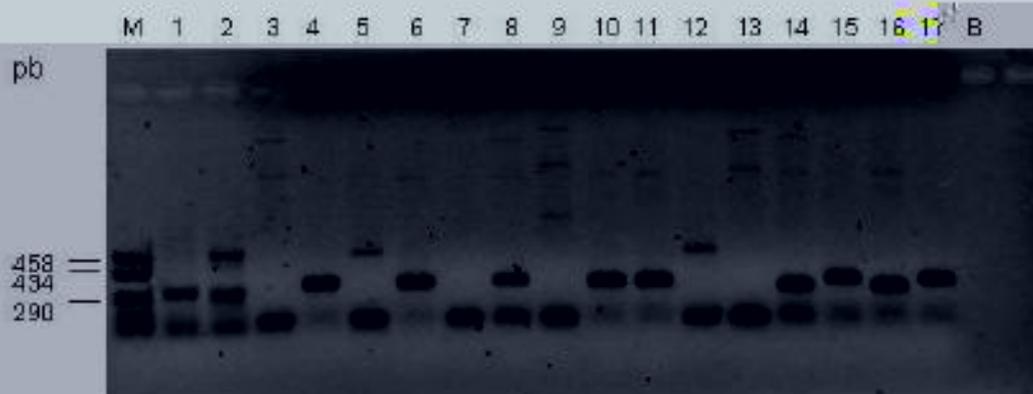


Figura 6: Resultado das PCRs utilizando-se os *primers* universais pUC/M13 direto e reverso e os DNAs plasmidiais contendo ou não o fragmento amplificado. A canaleta com o número 1, tanto em A como em B, representa o controle positivo da PCR (DNA de pGEM-*flw*587). A) 2 a 18: reações com os plasmídeos provenientes da clonagem do fragmento de 297 pb amplificado a partir do

```

297pbFurB.elk(587)  ATGGGCAAGA  CCGAGCAGCG  CCGTGTGATC  GCAGCGTGC  TGGCGAGGC  CATGGATCAC
297pbFurB.elk(5019)  ATGGGCAAGA  CCGAGCAGCG  CCGTGTGATC  GCAGCGTGC  TGGCGAGGC  CATGGATCAC
FurB.jap(USDA110)  ATGGGCAAGA  CCGAGCAGCG  CCGTGTGATC  GCAGCGTGC  TGGCGAGGC  CATGGATCAT
Consensus          *****
297pbFurB.elk(587)  CCGAGCGTGG  AGGAGCTCTA  CCGCGCGTGC  GTGGCGGTGG  ACGACAAGAT  CTGGATCTCG
297pbFurB.elk(5019)  CCGAGCGTGG  AGGAGCTCTA  CCGCGCGTGC  GTGGCGGTGG  ACGACAAGAT  CTGGATCTCG
FurB.jap(USDA110)  CCGAGCGTGG  AGGAATTATA  CCGCGCGTGC  GTGGCGGTGG  ACGACAAGAT  CTGGATCTCA
Consensus          ****  A  A  *****  A  A  ****  *****
297pbFurB.elk(587)  ACCGCTATGC  GCACCGTCAA  GCTGTTCCAG  GATGCCTGCA  TCAATCGAGC  CCAAGCACTT
297pbFurB.elk(5019)  ACCGCTATGC  GCACCGTCAA  GCTGTTCCAG  GATGCCTGCT  TCAATCGAGC  CCAAGCACTT
FurB.jap(USDA110)  ACCGCTATGC  GCACCGTCAA  GCTGTTCCAG  GATGCCTGCA  TCAATCGAGC  CCAAGCACTT
Consensus          *****
297pbFurB.elk(587)  CCGGAGGGCC  CCGCGCGCTA  CGAGCAGATG  CCGGAGAGCC  ATCACAGCCA  TCTGATCAAC
297pbFurB.elk(5019)  CCGGAGGGCC  CCGCGCGCTA  CGAGCAGATG  CCGGAGAGCC  ATCACAGCCA  TCTGATCAAC
FurB.jap(USDA110)  CCGGAGGGAC  CCGCGCGCTA  CGAGCAGATG  CCGGAGAGCC  ATCACAGCCA  CTTGATCAAT
Consensus          *****
297pbFurB.elk(587)  CTGGCGGAGC  GCAAGGTGAT  CGAGTTCACC  TCCGAGGAGA  TCGAGAGGCT  CCAAGCTG
297pbFurB.elk(5019)  CTGGCGGAGC  GCAAGGTGAT  CGAGTTCACC  TCCGAGGAGA  TCGAGAGGCT  CCAAGCTGA
FurB.jap(USDA110)  CTGGCGGAGC  GCAAGGTGAT  CGAGTTCACC  TCCGAGGAGA  TCGAGAGGCT  CCAAGCTGG
Consensus          *****

```

Figura 7: Alinhamento da sequência de nucleotídeos dos fragmentos de 297 pb dos genes *fur* de *B. alkali* SEMIA 587 [297pbFurB.elk(587)] e *B. alkali* SEMIA 5019 [297pbFurB.elk(5019)], amplificadas por PCR, com parte da região codificadora do gene *fur* de *B. japonicum* USDA 110 [FurB.jap(USDA110)]. Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos.

```

          ▽
99aaFurB.elk(587)  MRNTEQRRIARVLAEMDHPDVEELYRRCVAVDQKISISTVYRTRVLFEDAGIIEKLD
99aaFurB.elk(5019)  MRNTEQRRIARVLAEMDHPDVEELYRRCVAVDQKISISTVYRTRVLFEDAGIIEKLD
FurB.jap(USDA110)  MRNTEQRRIARVLAEMDHPDVEELYRRCVAVDQKISISTVYRTRVLFEDAGIIEKLD
Consensus          *****
          ▽  • • ▽          ▽          •
99aaFurB.elk(587)  REGRRARYEOMPESHHDHLINLRDGVIEFTSEEIEKLQA
99aaFurB.elk(5019)  REGRRARYEOMPESHHDHLINLRDGVIEFTSEEIEKLQA
FurB.jap(USDA110)  REGRRARYETMRDSHHDHLINLRDGVIEFTSEEIEKLQA
Consensus          *****

```

Figura 8: Alinhamento da sequência de aminoácidos derivados da tradução do fragmento de 297 nucleotídeos do gene *fur* de *B. alkali* SEMIA 587 [99aaFurB.elk(587)] e *B. alkali* SEMIA 5019 [99aaFurB.elk(5019)] com parte da proteína Fur de *B. japonicum* USDA110, aminoácidos 23 até 122 [FurB.jap(USDA110)]. Asteriscos indicam aminoácidos idênticos e dois pontos (:) indicam aminoácidos similares. Círculos fechados e triângulos abertos, respectivamente, indicam resíduos que participam do possível sítio de ligação ao Fe^{3+} (sítio regulador 1) e ao sítio de ligação ao Zn^{2+} (sítio estrutural 2), derivados de análises de cristalografia e espectroscopia da proteína Fur de *P. aeruginosa* e conservados em diversas proteínas Fur, incluindo a de *B. japonicum* e *E. coli* (Friedman e O'Brian, 2004).

4.2. Comparação entre os genomas de *B. japonicum* e *B. elkanii* em relação ao número de cópias e tamanho dos fragmentos contendo o gene *fur*

O fragmento de DNA contendo parte do gene *fur* de *B. elkanii* 587 foi utilizado como sonda em experimentos de hibridização com os DNAs genômicos de *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079, digeridos com diferentes enzimas de restrição (*Apa*I, *Hind*III e *Kpn*I). Esse experimento teve como finalidade verificar o número de cópias do gene *fur* no genoma dessas bactérias e comparar os padrões de hibridizações obtidos. Pela análise de tais padrões (Figura 9) pôde-se concluir que existe apenas uma única cópia do gene *fur* no genoma das bactérias analisadas e que os genomas diferem entre si em relação ao tamanho dos fragmentos que hibridizaram com a sonda utilizada. Para *B. elkanii* SEMIA 587 foram obtidas bandas de tamanho aproximado a 5,0 Kb para *Apa*I, 3,0 Kb para *Hind*III e 9,5 Kb para *Kpn*I e para *B. japonicum* SEMIA 5079 foram obtidas bandas de aproximadamente 4,5 Kb para *Apa*I, 7,0 Kb para *Hind*III e 8,0 Kb para *Kpn*I (Figura 9). O tamanho dos fragmentos foi estimado com base na comparação destes com fragmentos de tamanho conhecido do marcador de peso molecular utilizado no experimento, DNA de fago λ clivado com a enzima *Hind*III.

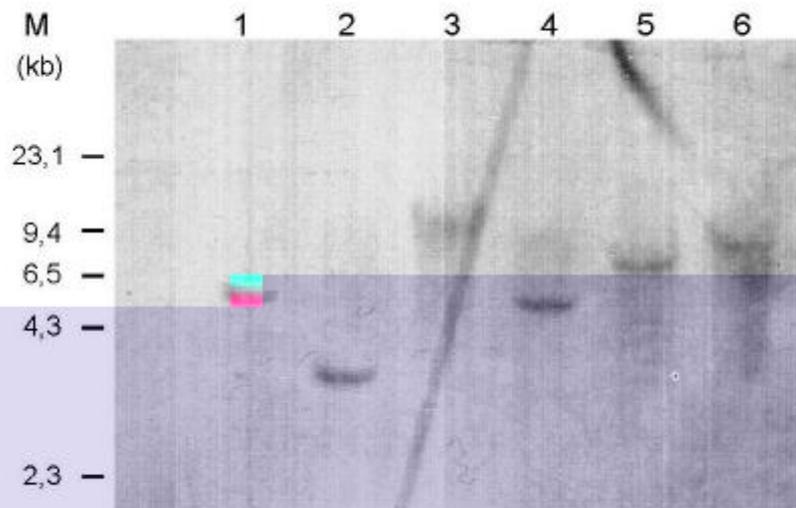


Figura 9: Padrão de hibridização do fragmento de 297 nucleotídeos do gene *fur* de *B. elkanii* com o DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079 digeridos com diferentes enzimas de restrição. M - Marcador de peso molecular (DNA de fago λ clivado com *Hind*III), DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 digerido com *Apa*I (1); com *Hind*III (2); e com *Kpn*I (3); DNA genômico de *B. japonicum* SEMIA 5079 digerido com *Apa*I (4); com *Hind*III (5); e com *Kpn*I (6).

4.3. Tentativa da obtenção da região reguladora do gene *fur* através da construção de uma biblioteca genômica parcial

Objetivando o isolamento da região reguladora do gene *fur* de *B. elkanii*, a primeira estratégia utilizada foi a construção de uma biblioteca parcial, enriquecida com fragmentos contendo essa região completa. Como os resultados obtidos no experimento anterior (item 4.2) apresentaram fragmentos de tamanhos relativamente grandes e de difícil clonagem, um novo Southern-*blot* genômico foi realizado. Dessa vez, os DNAs das bactérias *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079 foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI, que também não apresentava sítio de restrição nem no gene *fur* de *B. japonicum* e nem na região seqüenciada do gene *fur* de *B. elkanii*. Uma banda de hibridização de aproximadamente 2,0 Kb foi obtida para o DNA de *B. elkanii* SEMIA 587.

Já para o DNA de *B. japonicum* SEMIA 5079, uma banda de aproximadamente 4,0 Kb foi identificada (Figura 10). Mais uma vez, foi possível comprovar que ambos os genomas apresentam apenas uma única cópia do gene *fur*. O fragmento de 2,0 Kb do DNA de *B. elkanii* SEMIA 587 digerido com *EcoRI* apresentou um tamanho apropriado para a clonagem e, como o gene *fur* de *B. japonicum* USDA 110 completo é constituído de apenas 465 nucleotídeos, a possibilidade do gene *fur* completo de *B. elkanii* estar presente no fragmento de 2,0 Kb era bastante alta. A clonagem da região correspondente à banda de 2,0 Kb/*EcoRI* em pUC 18 rendeu aproximadamente 900 colônias brancas. A análise dessas colônias foi realizada através de hidridização de colônias, utilizando-se como sonda o fragmento amplificado na PCR com os *primers-fur* e o DNA de *B. elkanii* SEMIA 587. Foram selecionadas oito colônias que apresentaram sinal de hibridização mais forte. Essas tiveram seus plasmídeos extraídos e, posteriormente, clivados com a enzima de restrição *EcoRI* (Figura 11). Dois dos plasmídeos clivados apresentaram bandas de maior tamanho que as demais (plasmídeos 7 e 8) e tiveram as suas seqüências de nucleotídeos determinadas em quase sua totalidade. Entretanto, após a análise das seqüências foi constatado que nenhuma delas correspondia à região contendo o gene *fur* e nem as suas regiões reguladoras (dados não mostrados).

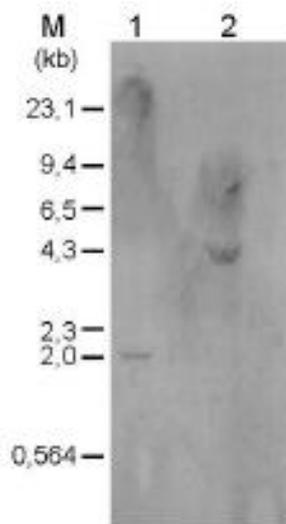


Figura 10: Padrão de hibridização do fragmento de 297 nucleotídeos do gene *fur* de *B. elkanii* 587 com o DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587 (1) e *B. japonicum* SEMIA 5079 (2) digeridos com a enzima *EcoRI*. M - Marcador de peso molecular (DNA de fago λ clivado com *HindIII*).

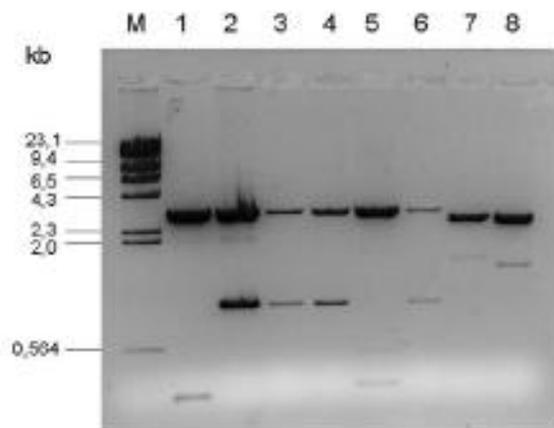


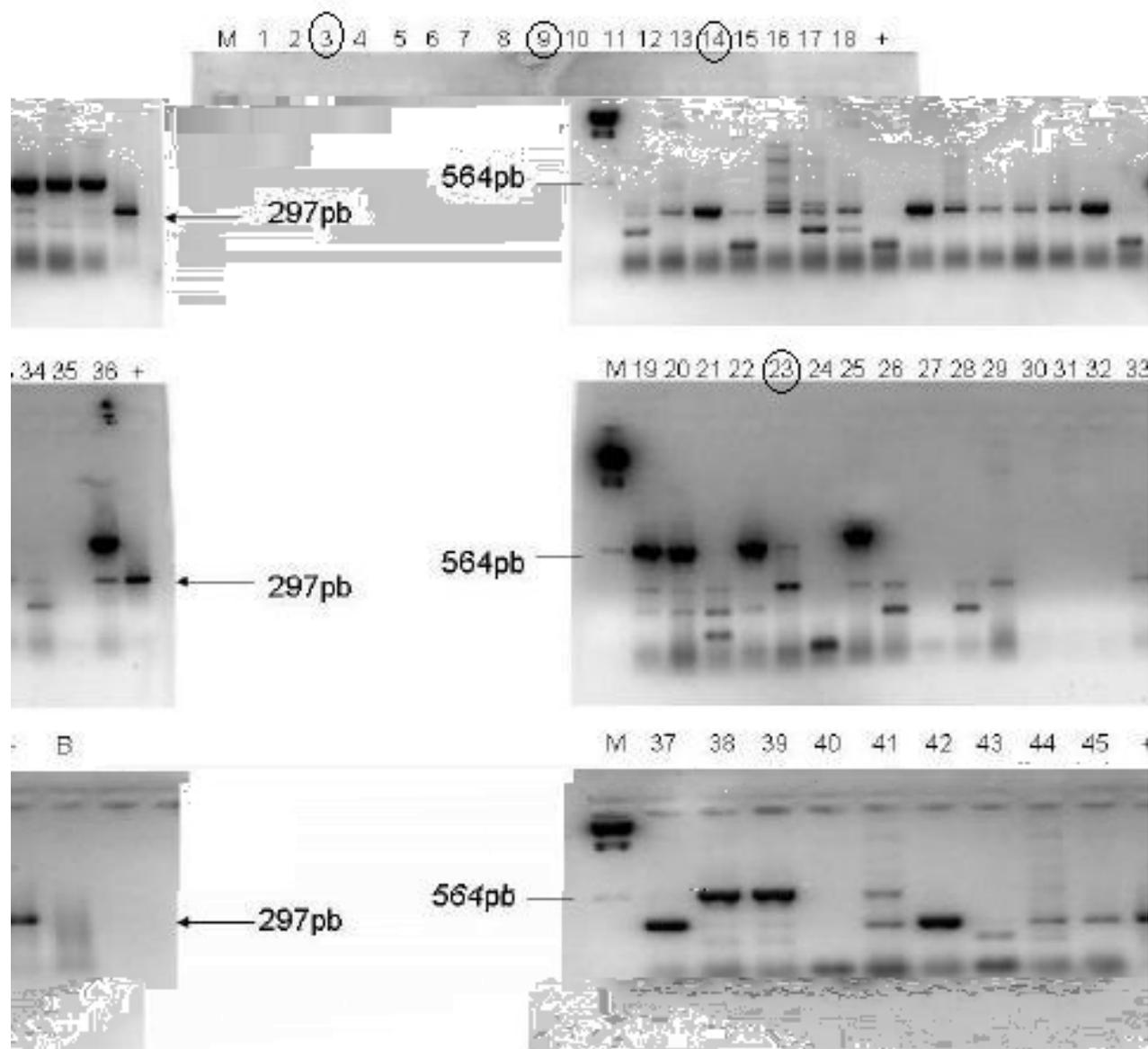
Figura 11: Resultado da clivagem com *EcoRI* de plasmídeos extraídos das colônias bacterianas que apresentaram sinais de hibridização mais fortes no experimento de hibridização de colônias. As bactérias foram transformadas com uma ligação entre pUC 18 clivado com *EcoRI* e o conjunto de fragmento de aproximadamente 2,0 Kb/*EcoRI*, purificado do genoma *B. elkanii* SEMIA 587. Os plasmídeos 7 e 8 apresentaram bandas de tamanhos maiores. M - Marcador de peso molecular (DNA de fago λ clivado com *HindIII*).

4.4. Obtenção da região reguladora do gene *fur* pela estratégia de *Site-Finding-PCR*

Os resultados insatisfatórios do experimento anterior (item 4.3) motivaram a utilização de uma nova estratégia, a fim de obter a região reguladora do gene *fur*. Para isso foram realizados experimentos de caminhada cromossômica. A metodologia foi padronizada a partir da técnica de *Site-Finding-PCR* descrita por Tan *et al.* (2005) (Figuras 3 e 4). A técnica foi aplicada para o isolamento da região à montante da porção conhecida do gene *fur*. Foram testados dois oligonucleotídeos *Site-Finders*, que diferem nos quatro nucleotídeos que determinam os sítios de incorporação no genoma (Figura 4). A Figura 12 apresenta, em gel de agarose 1,2%, o resultado das PCRs, utilizando-se tanto o *primer* SF1, como o SF2. As bandas mais discretas das duas reações foram purificadas e clonadas em pGEMT-*Easy*. Para confirmação dos clones, os plasmídeos das colônias brancas foram extraídos e com esses, realizou-se PCRs com os *primers-fur* (Figura 13). Desses, quatro (clones 3, 9, 14 e 23), que tiveram a amplificação de uma banda de 297 pb e foram oriundos da reação com o *primer* SF2 foram escolhidos para análise em maiores detalhes. Os plasmídeos foram digeridos com a enzima *EcoRI* (Figura 14) e liberaram fragmentos de tamanhos aproximados a 1,0 Kb. Esses plasmídeos foram seqüenciados e os resultados obtidos indicaram que os clones 3 e 9, contendo um fragmento de 641 pb cada, apresentavam grande parte do gene *fur* de *B. elkanii*, e, adicionalmente, 275 pb da região reguladora, ambos com seqüências idênticas. A Figura 15 apresenta a seqüência de nucleotídeos isolada do clone 3.



Figura 10: Rezultate de
 analiză de ADN a
 produselor de
 lactație de la
 ferme mici din
 județul Iași



e tiveram os
to foram os
ador de peso
positivo da

Figura 13: Resultado das PCRs utilizando como DNA-molde os plasmídeos que produtos do *Site-Finding-PCR* clonados. Os escolhidos para o seqüenciamento plasmídeos 3, 9, 14 e 23. A banda de 297 pb está indicada pela seta. M - Marcador molecular (DNA de fago λ clivado com *HindIII*). O sinal + indica o controle reação: plasmídeo pGEM-*fur587*; a letra B indica o branco das reações: sem DNA.

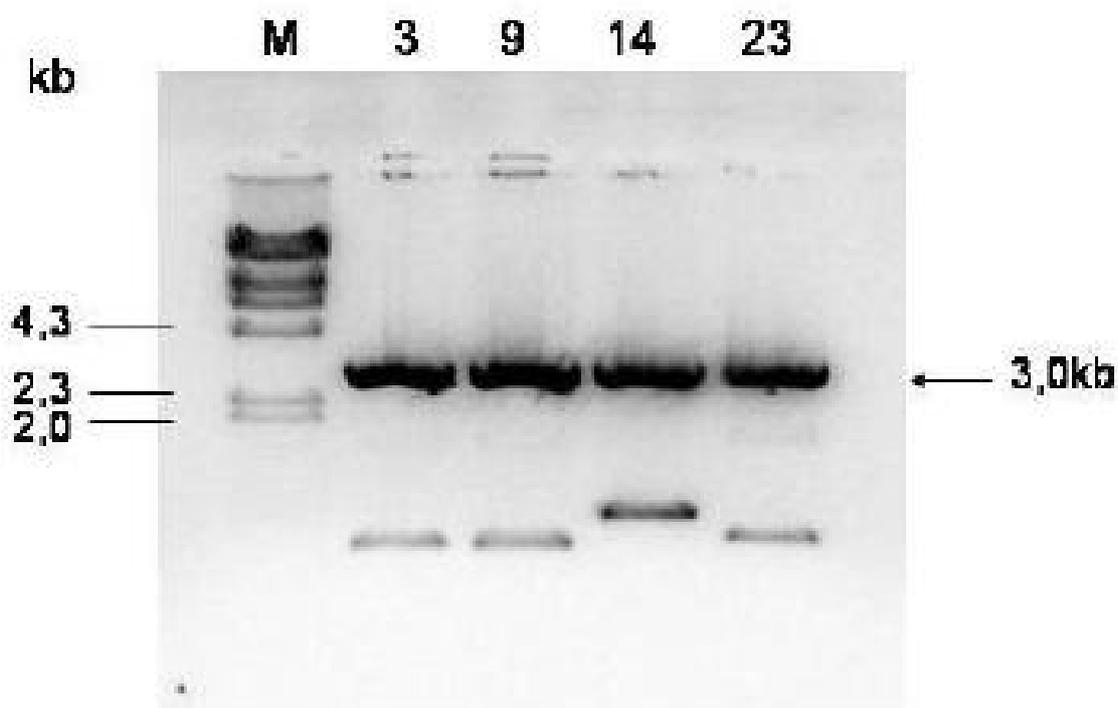


Figura 14: Plasmídeos 3, 9, 14 e 23 oriundos da transformação com os fragmentos purificados das reações do *Site-Finding-PCR*, digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*. M - Marcador de peso molecular (DNA de fago λ clivado com *HindIII*). A seta indica ao fragmento de 3,0 Kb correspondente ao vetor pGEMT-*ori*.

A)

```
TGCTGCTGACCCATTCTCGGCCATCTTGCCGGCCGGGGCATCCGCACCATCTTCCTCGAGGTGGAAGAGAACAATCAGCC
GGCGCGACGGCTCTATGAAAGGGCCGGATTTCGGCGTGATCGGCCGCCGCCGAAAGCTACTACAAGCAGCCCGGGGGGAAAC
ATTTGAACCGCGCTCTGATGCGGGCGGACTTGTCGTAAACATCGGGCGCGATGGCAGAACAGCGCCCTGCTCTGCCATCCAA
GGCCCAAGGATTGGCCAAGGACCTGCCAAGGACCCCTGACGACGGTGAAAATCACGCCTGCGCAGAAGAATACCGGCATC
GAGGCGCGCTGTCCTGCGACCGGCATGCGCATGACCGAACAGCGTCTGTGTGATCGCACCGCTGCTGGCGGAGGCCATGGA
TCACCCCGACGTGGAGGAGCTCTACCGCCGCTGCGTGGCGGTGACGACAAGATCTCGATCTCGACCGTCTATCGCACCG
TCAAGCTGTTTCGAGGATGCCGGCATCATCGAGCGCCACGACTTCCGCGAGGGCCCGCGCGCTACGAGCAGATGCCCGAG
AGCCATCACGACCATCTGATCAACCTGCGCGACGGCAAGGTGATCGAGTTCACCTCCGAGGAGATCGAGAAGCTCCAGGC
G
```

B)

```
test sequence
Length of sequence-      278
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      208 LDF- 1.76
-10 box at pos.      193 TCGTAACAT Score      55
-35 box at pos.      175 CTGATG      Score      17

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at      208:
  crp: TGTCGTAA at position      191 Score - 6
```

Figura 15: Sequência de 641 nucleotídeos obtida através da estratégia *Site-Finding-PCR*. A região 5' não é destacada em verde. A análise da região de 275 pb a montante do sítio de início do gene *fur* de *B. subtilis* 587, pelo programa BPROM, identificou as seguintes sequências destacadas (A): a região promotora está marcada em verde e sublinhada, o provável sítio de iniciação (G) está em azul e sublinhado e a sequência de Shine-Dalgarno está destacada em negrito e sublinhada. O sítio de início da tradução (ATG) da proteína Fur está em laranja e sublinhado. B) Resultados da análise da sequência de 275 pb pelo programa BPROM. Esse programa identificou, adicionalmente, um sítio de ligação para a proteína Crp na posição 191, que se sobrepõem parcialmente com a posição -10 do promotor.

4.5. Análise da seqüência do gene *fur* de *B. elkanii* e de sua região reguladora

O fragmento de 641 pb presente nos clones 3 e 9 contém os primeiros 366 pb da região codificadora do gene *fur*, juntamente com 275 pb da região reguladora. Tendo em vista que o tamanho desse gene em *B. japonicum* USDA110 é de 456 pb, ainda restam em torno de 90 pb da extremidade 3' a serem identificados.

Através de programas de análise de seqüências (*i.e.* BLAST), verificamos um alto grau de identidade dos 366 nucleotídeos da região codificadora do gene *fur* de *B. elkanii* SEMIA 587 com o gene *fur* de *B. japonicum* USDA 110 (90%), e altos graus de identidade e similaridade (90 e 94%, respectivamente) quando as seqüências foram comparadas em nível de aminoácidos. As Figuras 16 e 17 demonstram o alinhamento das seqüências de nucleotídeos e a derivada de aminoácidos, respectivamente, com seqüências correspondentes de bactérias que apresentaram maior grau de homologia com a seqüência de *Bradyrhizobium* (as mesmas utilizadas para a construção dos *primers fur*). A Tabela 4 apresenta a identidade e a similaridade da tradução dos 366 nucleotídeos da região codificante do gene *fur* de *B. elkanii* SEMIA 587 com a proteína Fur de diversos microrganismos.

Em relação à região contendo a seqüência reguladora, a análise dos 275 nucleotídeos que foram identificados à montante do sítio de início da tradução do gene *fur* não revelou a presença de regiões similares aos *Fur-box*, presentes em genes regulados pela proteína Fur. Também não foram encontradas similaridades com outras seqüências depositadas na página do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos – NCBI-USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através do programa BLASTN. Entretanto, quando essa região foi analisada pelo programa BPROM – *Prediction of Bacterial Promoters*, foram identificadas duas regiões com alta probabilidade de serem

reconhecidas como regiões promotoras para a RNA polimerase complexada com o fator sigma 70 de *E. coli*. Uma região de ligação ao ribossomo (RBS ou Shine-Dalgarno) típica, rica nos nucleotídeos contendo bases púricas, A e G, também foi identificada à distância de três nucleotídeos do sítio de início da tradução da proteína Fur. O programa BPROM também identificou o possível sítio de início de transcrição do gene *fur* de *B. elkani*, à distância de cinco nucleotídeos da suposta região -10 do promotor do gene. Esse programa identificou, adicionalmente, um sítio de ligação para a proteína Crp na posição 191, que se sobrepõem parcialmente com a posição -10 do promotor (Figura 15).

Tabela 4. Grau de similaridade e identidade da seqüência de aminoácidos derivada dos 366 nucleotídeos obtidos da região codificante do gene *fur* de *B. elkanii* SEMIA 587 com a proteína Fur de diversos organismos relacionados.

Proteína Fur	Bactéria	Identidade (%)	Similaridade (%)
	<i>Bradyrhizobium sp.</i> ORS278	92	95
	<i>Bradyrhizobium sp.</i> BTAi1	90	95
	<i>B. japonicum</i> USDA 110	90	94
	<i>B. japonicum</i> 61A152	90	94
	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	89	92
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	86	91
	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255	86	90
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53	91	93
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2	87	91
	<i>Nitrobacter sp.</i> Nb-311A	92	95
	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	78	85
	<i>Hoeflea phototrophica</i> DFL-43	70	81
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	75	85
	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1	72	86
	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	74	83
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	74	83
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	43	65
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> str. CT18	43	65

4.6. Análise da atividade da região promotora do gene *fur* de *Bradyrhizobium elkanii*

Com a finalidade de analisar se a seqüência de 275 nucleotídeos à montante do início da região codificadora do gene *fur* isolada continha uma região com atividade de promover a transcrição, o fragmento de 641 pb, obtido pela estratégia de *Site-Finding-PCR*, foi clonado no sítio de *EcoRI* do vetor pMC1403. Esse plasmídeo contém os genes que codificam a enzima β -galactosidase sem a região promotora, de forma que se uma seqüência de DNA clonada à montante do início do operon *lac* contiver uma região

reconhecida como região reguladora pela maquinaria de transcrição de *E. coli*, haverá a produção da enzima β -galactosidase. A linhagem de *E. coli* MC1061 foi utilizada como hospedeira. No entanto, como a seqüência analisada poderia conter uma região que respondesse de forma diferente à presença ou ausência de ferro, característica de genes regulados por esse metal, a análise da atividade de promotor dos 275 pb à montante do gene *fur* foi verificada na presença e ausência desse metal. Para isso foram utilizadas três linhagens bacterianas diferentes: uma linhagem de *E. coli* MC1061 contendo o plasmídeo pMC1403 recombinante (pMC-*fur*), outra contendo apenas o plasmídeo pMC1403 selvagem, e uma terceira sem nenhum plasmídeo (apenas uma linhagem de *E. coli* MC1061 selvagem). Os resultados de atividade de β -galactosidase estão apresentados na Figura 18 em unidades Miller. A análise estatística dos dados obtidos revelou diferença significativa ($P = 0,05$) quando a linhagem de *E. coli* contendo o plasmídeo pMC-*fur* foi multiplicada na presença de ferro, sugerindo não só a presença de uma região reconhecida pela maquinaria de transcrição da bactéria hospedeira como sendo uma região reguladora no fragmento clonado em pMC-*fur*, como também responsiva à presença de ferro.

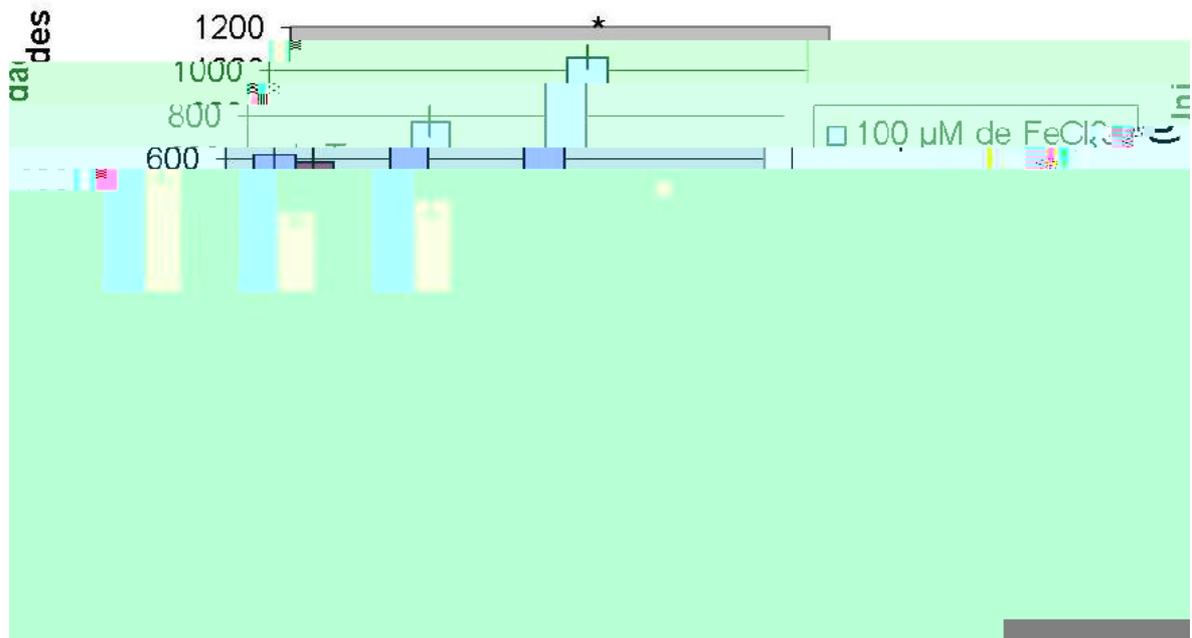


Figura 19. Atividade de β -galactosidase na presença ou ausência de ferro. Para a análise foram utilizadas linhagens de *E. coli* K12 (1051). Uma linhagem contendo o plasmídeo pMC1403 recombinante (pMC-*fur*), outra contendo apenas o plasmídeo pMC1403 selvagem, e uma terceira sem nenhum plasmídeo (apenas *E. coli* K12). A atividade de β -galactosidase foi expressa e medida em unidades Miller, como descrito no texto. * Média difere significativamente das demais. Os dados foram medidos em triplicata. Foi realizado uma análise de variância seguida do teste de Tukey ($P = 0,05$).

4.7. Construção de mutantes nulos de *B. elkanii* para o gene *fur*

Para a obtenção de linhagens mutantes de *B. elkanii* com o gene *fur* interrompido, inicialmente o plasmídeo pGEM-*fur*587 foi clivado com a enzima de restrição *Bgl*I e tratado com Klenow DNA polimerase e dNTPs para o preenchimento das extremidades coesivas. O fragmento clonado no pGEM-*fur* apresenta um sítio único de restrição para essa enzima. Um cassete contendo o gene marcador *aph*, que confere resistência à canamicina, e o gene repórter *uidA*, que codifica a enzima β -guluronidase foi inserido no sítio de *Bgl*I preenchido do plasmídeo pGEM-*fur*. A clonagem desse cassete no plasmídeo pGEM-*fur* pode ser verificada na Figura 19.

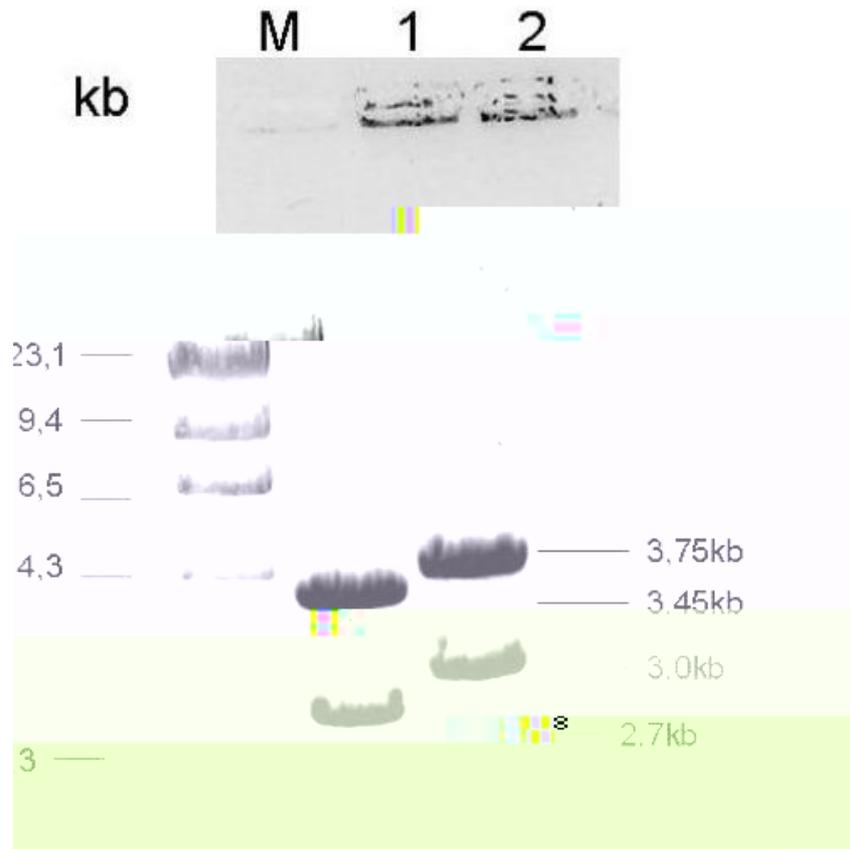


Figura 19: Clivagem de plasmídeos com a enzima de restrição *EcoRI*. 1 - Plasmídeo pWM6 liberando o vetor pUC18, de 2,7 Kb, e o cassete *fur*, de aproximadamente 3,45 Kb; 2 - Plasmídeo pGEM-cassete-*fur* liberando o plasmídeo pGEMT-*Easy*, de 3,0 Kb e uma banda de 3,75 Kb composta do cassete e o fragmento de 297 pb; 3 - M - Marcador de peso molecular (DNA de fago λ clivado com *HindIII*).

Uma vez obtido o plasmídeo pGEM-cassete-*fur*, esse foi clivado com *EcoRI* liberando a construção do fragmento de 297 pb interrompido pelo cassete (*cassete-fur*). Essa construção, de aproximadamente 3,75 Kb, foi subclonada no sítio de *EcoRI* do vetor suicida pSUP202 (possui o gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol). Esse plasmídeo foi denominado pSUP-cassete-*fur*. A clonagem do cassete-*fur* no plasmídeo pSUP pode ser verificada na Figura 20. Entretanto, como pode ser observado nessa figura, aparentemente não só o fragmento correspondente ao cassete-*fur* foi clonado no pSUP202,

como também o plasmídeo pGEMT-*Easy*. Uma vez que tais plasmídeos são incompatíveis, por apresentarem origem de replicações relacionadas [ColE1 para pSUP202 e pMB1 para pGEMT-*Easy*, a qual é extremamente relacionada à ColE1 e, portanto, pertencente ao mesmo grupo de incompatibilidade (ver endereço <http://www1.qiagen.com/Plasmid/BacterialCultures.aspx?>)], a única possibilidade de ambos os plasmídeos estarem presentes na mesma célula bacteriana seria através da fusão desses em uma única molécula. Esse resultado, entretanto, não impediu o prosseguimento do experimento, uma vez que o plasmídeo pSUP202 serviria apenas como veículo para a transferência do cassete-*fur* para a região correspondente ao gene *fur* no genoma de *B. elkanii*.

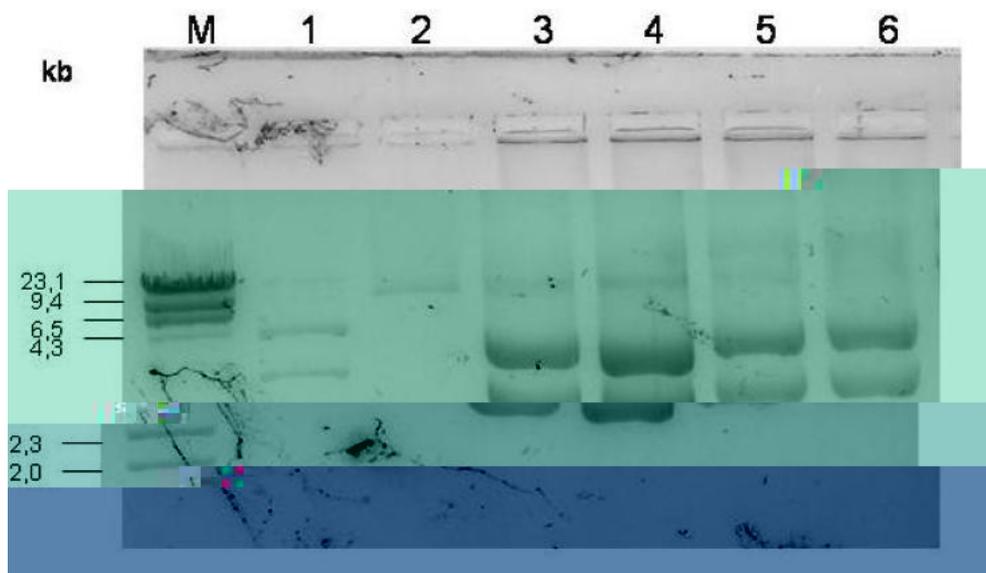


Figura 20: Clonagem do fragmento de DNA. Os plasmídeos pGEMT-*Easy* e pSUP202 foram clivados com *EcoRI*. 1 – pGEM-*fur*, liberando os fragmentos correspondentes ao vetor pGEMT-*Easy* (3,0 Kb) e ao cassete-*fur* (3,75 Kb); 2 – plasmídeo pSUP202, de 10,0 Kb. M – marcador de peso molecular (DNA de lagoa) clivado com *EcoRI*. A diferença de migração entre os fragmentos presentes nos lanes 1 e 2 é de 0,75 Kb.

O plasmídeo pSUP202-cassete-*fur* foi inserido na bactéria hospedeira *E. coli* S17-1, que contém os genes para transferência plasmidial via conjugação. Foi, então, realizada a conjugação entre *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo recombinante pSUP-cassete-*fur* e *B. elkanii* SEMIA 587. A seleção das bactérias *B. elkanii* SEMIA 587 trans-conjugantes foi realizada em meio LM contendo canamicina, marca de resistência cromossômica de *B. elkanii*. A linhagem de *E. coli* S17-1 é incapaz de se multiplicar na presença desse antibiótico. A confirmação da presença do cassete-*fur* no genoma das bactérias trans-conjugantes foi realizada através de PCR utilizando-se um par de *primers* que amplifica um fragmento de 412 pb da região codificadora do gene *uidA*. Como demonstrado na Figura 21, os 12 possíveis trans-conjugantes apresentaram a banda de amplificação correspondente ao gene *uidA*. A próxima etapa será a realização de um Southern-*blot* genômico com DNAs extraídos dessas estirpes, utilizando-se como sonda o fragmento de 641 pb correspondente ao gene *fur*, previamente isolado. Caso algum dos trans-conjugantes apresente uma banda de hibridização com tamanho maior do que o da estirpe selvagem esse será considerado como uma possível estirpe de *B. elkanii* mutante para o gene *fur*. Experimentos de nodulação e competição também serão realizados com essa estirpe mutante.

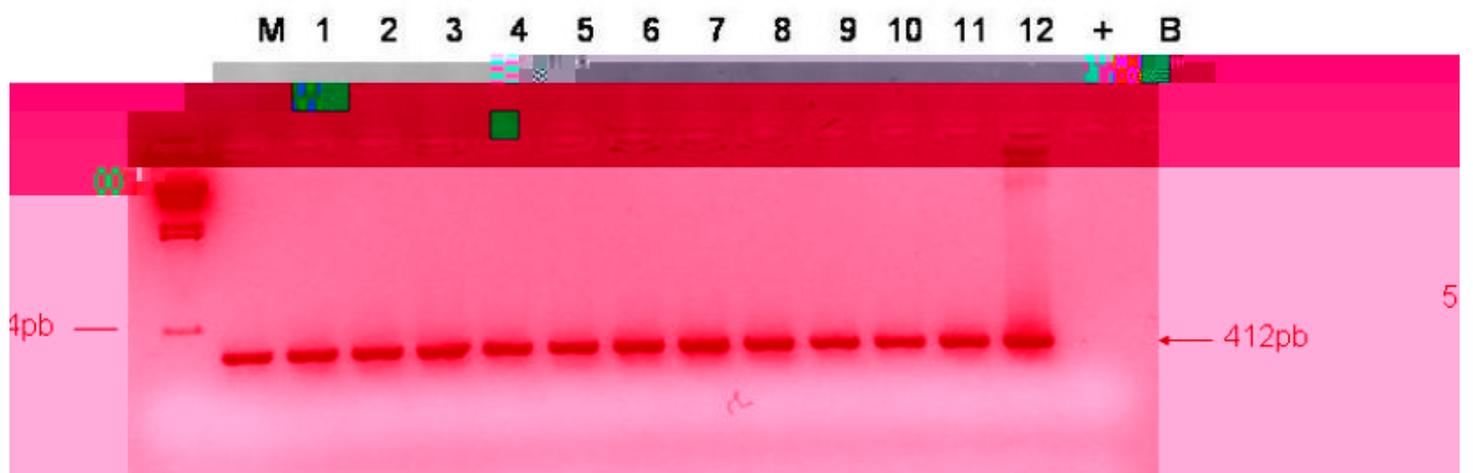


Figura 21: Resultado da PCR utilizando o DNA genômico de 12 linhagens de *B. elkanii* EMIA 587 trans-conjugantes (1 – 12) com o par de *primers* que amplifica um fragmento de 412 pb da região codificadora do gene *uidA*. + - reação utilizando como DNA molde o plasmídeo pWM6. M – Marcador de peso molecular (DNA de fago λ), clivado com *Hind*III. A seta indica o fragmento de 412 pb amplificado. B corresponde ao branco da reação: sem DNA.

5. Discussão

Por ser um elemento extremamente importante em diversos processos biológicos, como a fotossíntese, a fixação de nitrogênio, metanogênese, produção e consumo de H₂, respiração, ciclo do ácido tricloroacético (TCA), transporte de oxigênio, regulação gênica e biossíntese do DNA (revisado em Andrews *et al.*, 2003), a presença de ferro dentro das células deve ser muito bem regulada. Se por um lado esse metal participa de muitas metaloproteínas ou metaloenzimas, o excesso de ferro intracelular pode ser deletério, pois ele geralmente reage com espécies de oxigênio, através da reação de Fenton, que danificam componentes celulares (Braun e Killmann, 1999; Touati, 2000). Em vista disso, as bactérias apresentam diversas proteínas para regular o metabolismo de ferro em resposta à sua disponibilidade. A proteína Fur, alvo de estudo do presente trabalho, atua, na maioria dos casos, como um repressor positivo, reprimindo a transcrição de seus genes-alvo quando interage com o Fe²⁺, seu co-repressor. Na ausência de Fe²⁺ ocorre a desrepressão dos genes (Figura 1, Andrews *et al.*, 2003). Devido à importância de Fur na regulação de diversos genes (Tabela 1) e à carência de informação a respeito do gene *fur* e da proteína correspondente em *B. elkanii*, esse trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização do gene *fur* de *B. elkanii*, visando-se um melhor entendimento da função e dos mecanismos de regulação do sistema de resposta ao ferro nessa bactéria.

A comparação entre as seqüências de genes *fur* de diversas bactérias disponíveis nos bancos de dados demonstrou que esse gene é bastante conservado, mesmo entre espécies bacterianas distantemente relacionadas. Com base nessa comparação, foi possível a projeção de um par de oligonucleotídeos iniciadores, cujas seqüências foram idênticas às seqüências do gene *fur* de *B. japonicum* USDA 110 (Figura 2). O fragmento de

297 pb amplificado a partir dos DNAs genômicos de *B. elkanii* 587 e 5019 apresentaram uma homologia significativa com a do gene *fur* de *B. japonicum*, bem como com a proteína Fur dessa bactéria (Figuras 7 e 8). Analisando-se detalhadamente as seqüências de nucleotídeos e as derivadas de aminoácidos das duas estirpes de *B. elkanii* utilizadas nesse trabalho (*B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019) pôde-se perceber que, apesar de compartilharem alta homologia entre si, existem diferenças entre as duas seqüências. Tais estirpes foram isoladas de lavouras de soja do RS e fazem parte do grupo de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para uso em inoculantes comerciais no Brasil. Entretanto, o sucesso da inoculação com as estirpes recomendadas depende, em parte, da sua capacidade de persistir no solo e, assim, competir com a microbiota nativa já estabelecida. A competição entre estirpes no solo é complexa e é causada por diferentes fatores, como as características de cada estirpe, o hospedeiro com o qual se relaciona, a interação planta-microrganismo e o impacto do ambiente sobre eles. Alguns experimentos mostram que as estirpes de rizóbios podem se naturalizar, sofrendo alterações nas características morfológicas, fisiológicas, genéticas e simbióticas, o que as tornam distintas das estirpes introduzidas inicialmente (Boddey e Hungria, 1997; Ferreira e Hungria, 2002). Isso poderia explicar, em parte, as diferenças observadas em nível de seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos. Apesar disso, as seqüências de aminoácidos da proteína Fur de ambas as estirpes de *B. elkanii* apresentam os resíduos importantes para a ligação ao Fe^{2+} (sítio regulador 1) e ao Zn^{2+} (sítio estrutural 2), conservados em várias outras proteínas Fur, incluindo a de *B. japonicum*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (Figura 8, Friedman e O'Brian, 2004).

Uma vez obtido um fragmento contendo parte do gene *fur* de *B. elkanii*, a próxima etapa do trabalho foi a de investigar o número de cópias desse gene no genoma da

estirpe de *B. elkanii* 587, a qual foi a escolhida para a continuidade dos trabalhos. A estirpe de *B. japonicum* SEMIA 5079 foi usada para comparação. Pelos resultados obtidos, a partir da clivagem dos DNAs com quatro enzimas de restrição diferentes, pôde-se constatar que os genomas diferem bastante quanto aos padrões de hibridização para todas as enzimas testadas (Figuras 9 e 10), corroborando com as evidências que levaram à separação entre *B. japonicum* e *B. elkanii* observadas por diversos pesquisadores (Stanley, 1985; Minamisawa, 1990; Minamisawa, 1992; Rumjanek *et al.*, 1993; Boddey e Hungria, 1997) e por dados obtidos no Laboratório de Genética Molecular Vegetal. Vale ressaltar, também, que ambas as espécies apresentaram, para as quatro enzimas de restrição utilizadas, apenas uma banda de hibridização, evidenciando que existe apenas uma única cópia do gene *fur* em seus genomas.

Com o intuito de isolar um fragmento contendo a seqüência completa do gene *fur* e as suas regiões reguladoras, a primeira estratégia utilizada foi a construção de uma biblioteca parcial, contendo fragmentos de tamanhos aproximados a 2,0 Kb, provenientes da clivagem com *EcoRI* (que não apresenta sítio de clivagem dentro da região codificadora do gene *fur* de *B. japonicum*). Essa informação foi obtida a partir do Southern-*blot* genômico, cujo padrão de hibridização é apresentado na Figura 10. Como o gene *fur* de *B. japonicum* apresenta um tamanho de 465 nucleotídeos, um fragmento de 2,0 Kb de tamanho muito provavelmente conteria o gene completo e as regiões adjacentes. Após a análise de um grande número de colônias e do seqüenciamento de alguns clones que apresentaram sinal de hibridização relativamente forte, não foi possível a obtenção de tal fragmento. Foram obtidas regiões que não tinham relação alguma com a seqüência desejada, demonstrando que haveria a necessidade de analisar um número maior ainda de colônias brancas para identificar àquela que conteria a região correspondente à do gene *fur*.

Em vista desse resultado negativo, a próxima abordagem foi a utilização da estratégia de *Site-Finding-PCR*. Essa nova abordagem mostrou-se bem mais satisfatória e, após a análise de diversos clones, dois demonstraram conter uma região correspondente ao gene *fur*, acrescentando aos 297 nucleotídeos anteriormente conhecidos, 344 pb. Esse resultado permitiu a identificação da região inicial do gene, bem como de 275 nucleotídeos de sua região reguladora.

A identidade e similaridade da seqüência de aminoácidos derivada da tradução dos 366 pb do gene *fur* de *B. elkanii* é alta quando comparada com a seqüência da proteína Fur de bactérias relacionadas (Tabela 4). O nível de homologia também é bastante elevado quando comparada com bactérias como *E. coli* e *Salmonella enterica* (Tabela 4). Na proteína Fur de diversas bactérias, como, por exemplo, *Rhizobium leguminosarum*, há uma seqüência altamente conservada, HHDH (De Luca *et al.*, 1998). Essa se encontra na região C-terminal dessa proteína, sendo importante para sua função (Saito *et al.*, 1991). A Figura 17 demonstra que as proteínas Fur de todas as bactérias utilizadas para a construção dos *primers-fur* apresentam essa seqüência, e que a mesma também está presente na porção da proteína Fur de *B. elkanii* identificada nesse trabalho. Isso sugere que essa seqüência consenso também é importante para a função da proteína Fur nessa bactéria.

Outra região conservada da proteína Fur se encontra na região N-terminal, representada por pelo motivo GLATVYR em *E. coli*, onde o resíduo “G” é necessário para ligação no DNA (Coy, 1995). Em *R. leguminosarum* a seqüência correspondente é representada pelo motivo SISTVYR (de Luca *et al.*, 1998), em que o resíduo “G” altamente conservado é substituído por um resíduo “S”; um resíduo “S” também ocorre na posição correspondente da proteína Fur de *Brucella abortus* (Phillips *et al.*, 1997). A Figura 17 demonstra que as proteínas Fur de todas as bactérias utilizadas para a construção dos

primers-fur apresentam a seqüência correspondente à de *Rh. leguminosarum*, incluindo a porção da proteína Fur de *B. elkanii* aqui identificada. Assim, nessas bactérias, a configuração do domínio de ligação ao DNA da proteína Fur difere daquela do domínio de *E. coli*.

Genes que são regulados por Fur contém uma seqüência chamada *Fur-box* (GATAATGATAATCATTATC) (Calderwood e Mekalanos, 1988; De Lorenzo *et al.*, 1988), podendo ser ainda interpretada alternativamente, como seqüências palindrômicas de 9-1-9 pb, três hexâmeros repetidos, ou duas repetições invertidas sobrepostas 7-1-7 pb (Baichoo e Helmann, 2002; Lavrrar e McIntosh, 2003). Entretanto, não foram identificadas seqüências consenso nos 275 pb da região à montante do gene *fur* de *B. elkanii*, sugerindo que nessa bactéria o gene *fur* não é auto-regulado. O mesmo foi verificado em 522 pb à montante do gene *fur* de *R. leguminosarum* (de Luca *et al.*, 1998) e não existem informações disponíveis a respeito da região reguladora do gene *fur* de *B. japonicum*.

De Lorenzo *et al* (1988) demonstraram que a expressão de *fur* está sob o controle da proteína receptora de AMP cíclico (Crp) em *E. coli*, apesar destes autores terem utilizado apenas 80 pb como seqüência promotora. Utilizando o programa BPROM – *Prediction of Bacterial Promoters*, que reconhece promotores para o fator sigma 70, foi encontrada uma região, na posição 191 dos 275 nucleotídeos à montante do gene *fur* de *B. elkanii*, que poderia servir como sítio de ligação para a proteína Crp (TGTCGTAA) (Figura 15). Essa região se sobreporia à região identificada como possível seqüência promotora da transcrição desse gene. Ensaios de mutagênese sítio-direcionada envolvendo os nucleotídeos que participam dessa região poderão auxiliar no esclarecimento do papel da proteína Crp na ativação da transcrição do gene *fur* e se a região tem mesmo função de promotor desse gene.

Independentemente do fato de não ter sido detectada nenhuma região típica de genes regulados por *fur* nos 275 pb identificados à montante do sítio de início de tradução desse gene, o fragmento de 641 pb isolado no experimento de *Site-Finding-PCR* foi subclonado no vetor pMC1403 (Casadaban *et al.*, 1983). Os resultados obtidos demonstraram que a linhagem de *E. coli* MC1061 contendo o plasmídeo pMC1403 recombinante (pMC-*fur*) apresentou uma maior atividade de β -galactosidase na presença de ferro, quando comparada com a atividade apresentada na ausência do metal. Esse resultado sugere que a região clonada no vetor pMC1403 apresenta uma seqüência de nucleotídeos que é reconhecida como seqüência promotora pela maquinaria de transcrição da bactéria hospedeira e que, além disso, essa seqüência responde de forma diferente em relação à presença de ferro. Novamente, experimentos de mutagênese sítio-direcionada irão esclarecer a participação dos nucleotídeos que constituem a possível região promotora do gene *fur* de *B. elkanii*. Também será importante a análise da atividade dessa região na própria bactéria *B. elkanii*, a fim de confirmarmos o papel dessa na ativação da transcrição desse gene no sistema homólogo. De Luca *et al.* (1998) estudaram a expressão do gene *fur* em diferentes linhagens de *Rh. leguminosarum* e verificaram que *fur* era expresso constitutivamente, com atividade de cerca de 200 unidades Miller, tanto na presença, como na ausência de ferro no meio. Entretanto, em *Rhizobium*, *fur* foi considerado essencial à viabilidade e mutantes nulos para esse gene não são viáveis. Para *B. japonicum*, por outro lado, mutantes *fur* são possíveis (Hamza *et al.*, 1999), indicando que a regulação desse gene é bastante diferente nessas espécies. Cabe salientar, contudo, que nos artigos onde a expressão de *fur* foi analisada através da dosagem de atividade de β -galactosidase, a condição sem ferro do meio foi obtida a partir da utilização do quelante de ferro, α - α -dipirridil. No experimento realizado nesse trabalho, pelo fato de que não foi possível a

obtenção desse reagente em tempo hábil para a apresentação dessa dissertação, tomou-se o cuidado de lavar-se muito bem toda a vidraria utilizada no experimento, mas não se pode descartar a presença de ferro exógeno, contido nos reagentes utilizados no preparo do meio de cultura. Desse modo, o experimento de análise de expressão será repetido na presença de tal quelante para controlar, da melhor forma possível, a quantidade de ferro no experimento.

Com relação a mutantes, Fur parece essencial tanto para bactérias patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitidis*, como para rizóbios simbióticos, como *R. leguminosarum* (de Luca *et al.*, 1998), no mencionado anteriormente. Esses achados contrastam com a situação de, por exemplo, *B. japonicum* e *Sinorhizobium meliloti*, em que estirpes de mutantes *fur* viáveis foram obtidas (Hamza *et al.*, 1999; Chao *et al.*, 2004). Benson e colaboradores (2004) selecionaram mutantes *fur* de *B. japonicum* através de resistência a manganês e demonstraram que esses são incapazes de formarem nódulos em simbiose com a soja.

Para *B. elkanii*, os resultados obtidos nesse trabalho indicam que é possível a obtenção de mutantes viáveis, ou seja, que a proteína Fur não é essencial para essa bactéria. Entretanto, apesar de, aparentemente, ter-se obtido a inserção do cassete-*fur* no genoma de 12 trans-conjugantes, testes adicionais são necessários para comprovar o local exato da integração. Caso essa tenha realmente ocorrido na região desejada, interrompendo o gene *fur* em algum dos trans-conjugantes, esse será avaliado em experimentos de modulação e competição, como uma ferramenta para a elucidação do papel do gene *fur* em *B. elkanii*.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

6.1. *B. elkanii* SEMIA 587 apresenta uma cópia do gene *fur* em seu genoma e essa cópia tem um alto grau de homologia, em nível de nucleotídeos, e de homologia e similaridade, em nível de aminoácidos, com seqüências de genes (e proteínas) *fur* (Fur) de diversas bactérias, relacionadas ou não a essa espécie;

6.2. Na região reguladora do gene *fur* de *B. elkanii* SEMIA 587 não foi encontrada seqüência com similaridade ao *Fur-box*, indicando que esse gene não é auto-regulado nessa bactéria;

6.3. A região reguladora do gene *fur* de *B. elkanii* SEMIA 587, quando analisada em um sistema de expressão heterólogo, demonstrou ser responsiva à presença de ferro;

6.4. Dados preliminares indicam que é possível a obtenção de um mutante nulo de *B. elkanii* para o gene *fur*.

7. Referências bibliográficas

Alami Y, Achouak W, Marol C and Heulin T (2000) Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3393–3398.

Alberton O, Kaschuk G and Hungria M (2006) Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem* 38:1298–1307.

Althaus EW, Outten CE, Olson, KE, Cao, H and O'Halloran TV (1999) The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 38:6559-6569.

Andrews SC, Robinson AK and Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215–37.

Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R and Lalande R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204:57–67.

Andrade DS, Murphy PJ and Giller KE (2002) Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. *Soil Biol Biochem* 34:477-485.

Atlas R and Bartha R (1998) *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Addison Wesley Longman, New York, 548pp.

Bagg A and Neiland JB (1985) Mapping of a mutation affecting regulation of iron uptake systems in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 161:450-453.

Baichoo N and Helmann JD (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* 184:5826–5832.

Baichoo N, Wang T, Ye R and Helmann JD (2002) Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvationstimulon. *Mol Microbiol* 45:1613–1629.

Barrett CF and Parker MA (2006) Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp nodule bacteria on two *Mimosa* spp. *Appl Environ Microbiol* 72:1198–1206.

Beaumont HJ, Lens SI, Reijnders WN, Westerhoff HV and van Spanning RJ (2004) Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. *Mol Microbiol* 54:148–158.

Bellini P and Hemmings AM (2006) In vitro characterization of a bacterial manganese uptake regulator of the Fur superfamily. *Biochemistry* 45:2686–2698.

Benite AMC, Machado SP and Machado BC (2002) Sideróforos: “Uma resposta dos microorganismos”. *Quim. Nova* 25:1155-1164.

Benson HP, LeVier K and Guerinot ML (2004) A dominant-negative *fur* mutation in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 186:1409–1414.

Boddey LH and Hungria M (1997) Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. *Biol Fertil Soils* 25:407–415.

Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F and Luna V (2007) Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:874–880.

Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P and Cellier MF (2002) Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 70:6032–6042.

Braun V and Killmann H (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* 24:104-109.

Bsat N, Herbig A, Casillas-Martinez L, Setlow P and Helmann JD (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.* 29:189-198.

Butler A (1998) Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. *Science* 281:207-209.

Calderwood SB and Mekalanos JJ (1988) Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid. *J Bacteriol* 170:1015–1017.

Campo RJ and Hungria M (2004) Economical and environmental benefits of inoculation and biological nitrogen fixation with the soybean: situation in South America. In: Proceedings VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja. Foz do Iguassu, PR, Brasil.

Carrilo GC and Varquez MRG (1992) Comparative study of siderophore-like activity of *Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Plant Nutrition* 15:579-590.

Casadaban MJ, Martinez-Arias A, Shapiro SK and Chou J (1983) β -Galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods Enzymol* 100: 293–308.

Castro S, Carrera I and Martinez-Drets G (2000) Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *Journal of Microbiological Methods* 41:173-177.

Chao TC, Becker A, Buhrmester J, Pühler A and Weidner S (2004) The *Sinorhizobium meliloti* fur gene regulates, with dependence on Mn(II), transcription of the sitABCD operon, encoding a metal-type transporter. J Bacteriol 186:3609–3620.

Chao TC, Buhrmester J, Hansmeier N, Pühler A and Weidner S (2005) Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. Appl Environ Microbiol 71:5969–5982.

Chen WM, Laevens S, Lee T-M, Coenye T, De Vos P, Mergeay M and Vandamme P (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patients. Int J Syst Evol Microbiol 51:1729–1735.

Chipperfield JR and Ratledge C (2000) Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. Biometals 13:165–168.

Coy M (1995) The interaction of the ferric uptake regulation protein with DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun 212:784-792.

Davis BM, Quinones M, Pratt J, Ding Y and Waldor MK (2005) Characterization of the small untranslated RNA RyhB and its regulon in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol 187:4005–4014.

Delany, I, Spohn G, Rappuoli, R and Scarlato, V (2001) The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 42:1297-1309.

De Lorenzo V, Herrero M, Giovannini F and Neilands JB (1988) Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (cataboliteactivator protein) modulate transcription of fur gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 173:537–546.

De Luca NG, Wexler M, Pereira MJ, Yeoman KH and Johnston AW (1998) Is the fur gene of *Rhizobium leguminosarum* essential? *FEMS Microbiol Lett* 168:289–295.

Diaz-Mireles E, Wexler M, Sawers G, Bellini D, Todd JD and Johnston AW (2004) The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn²⁺-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* 150:1447–1456.

Diaz-Mireles E, Wexler M, Todd JD, Bellini D, Johnston AW and Sawers RG (2005) The manganese-responsive repressor Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a member of the Fur-superfamily that recognizes an unusual operator sequence. *Microbiology* 151: 4071–4078.

Ducey TF, Carson MB, Orvis J, Stintzi AP and Dyer DW (2005) Identification of the iron-responsive genes of *Neisseria gonorrhoeae* by microarray analysis in defined medium. *J Bacteriol* 187: 4865–4874.

Duhan JS and Dudeja SS (1999) Competitiveness does not correlate with siderophore production in *Rhizobium-Cajanus cajans* symbiosis. *Symbiosis* 26:79-87.

Ernst JF, Bennett RL and Rothfield LI (1978) Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 135:928–934.

Escolar L, Perez-Martin J and De Lorenzo V (1999) Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181:6223-6229.

Escolar L, Perez-Martin J and De Lorenzo V (2000) Evidence of an unusual long operator for the Fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275:24709-24714.

Fabiano E, Gill PR, Noya F, Bagnasco P, De La Fuente L and Arias A (1995) Siderophore-mediated iron acquisition mutants in *Rhizobium meliloti* 242 and its effect on the nodulation kinetics of alfalfa nodules. *Symbiosis* 10:197-211.

Fecker L and Braun V (1983) Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron (III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 156:1301-1314

Ferreira MC and Hungria M (2002) Recovery of soybean inoculant strains from uncropped 23 soils in Brazil. *Field Crops Res* 79:139–152

Foster JW and Hall HK (1992) Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (fur) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* 174:4317-4323.

Friedman YE and O'Brian MR (2003) A novel DNA-binding site for the ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* 278:38395–38401.

Friedman YE and O'Brian MR (2004) The ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor in vitro. *J Biol Chem* 279:32100–32105.

Gaballa A and Helmann JD (1998) Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180:5815-5821.

Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K and Ramos JL (1997) AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:393–410.

Gaudu P, Moon N and Weiss B (1997) Regulation of the soxRS oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo. *J Biol Chem* 272:5082–5086.

Geurts R and Bisseling T (2002) *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell* 14:S239-S240.

Gonzalez de Peredo A, Saint-Pierre C, Latour JM, Michaud-Soret I and Forest E (2001) Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* 310: 83–91.

Grifantini R, Frigimelica E, Delany I, Bartolini E, Giovinazzi S, Balloni S, Agarwal S, Galli G, Genco C and Grandi G (2004) Characterization of a novel *Neisseria meningitidis* Fur and iron-regulated operon required for protection from oxidative stress: utility of DNA microarray in the assignment of the biological role of hypothetical genes. *Mol Microbiol* 54: 962–979.

Guerinot ML, Meidl EJ and Plessner O (1990) Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* 14:3298-3303.

Hamza I, Chauhan S, Hassett R and O'Brian MR (1998) The bacterial Irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J Biol Chem* 273:21669–21674.

Hamza I, Hassett R and O'Brian MR (1999) Identification of a functional fur gene in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 181:5843–5846.

Hamza I, Qi Z, King ND and O'Brian MR (2000) Fur-independent regulation of iron metabolism by Irr in *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* 146:669–676.

Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet.* 182:288–292

Hantke K. (1984). Cloning of the repressor protein gene of iron regulated system in *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 197:337-341.

Harvey PJ, Campanella BF, Castro PM, Harm H, Lichtfouse E, Schaffner AR, Smrcek S and Werck-Reichhart D (2002) Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science and Pollution Research International* 9:29–47.

Hidalgo E and Demple B (1997) Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the *soxS* gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor. *EMBO J.* 16:1056–1065.

Jacquamet L, Aberdam D, Adrait A, Hazemann JL, Latour JM, and Michaud-Soret I (1998) X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37: 2564– 2571.

Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 32:136-139

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, *et al.* (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9:225-256.

Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM and Maguire ME (2002) SitABCD is the alkaline Mn21 transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 184:3159–3166.

Keon RG, Fu R and Voordouw G (1997) Deletion of two downstream genes alters expression of the hmc operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough. *Arch Microbiol* 167:376–383.

Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE and Udell SE (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol* 38:501-505.

Kuykendall LD, Young JM, Martinez-Romero E, Kerr A and Sawada H (2005) *Rhizobium*. *Bergey's Manual. Volume Two. The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer, New York, pp325-340.

Lafay B and Burdon JJ (1998) Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. *Appl Environ Microbiol* 64:3989–3997.

Lavrrar JL and McIntosh MA (2003) Architecture of a Fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* 185:2194–2202.

LeVier K and Guerinot ML (1996) The *Bradyrhizobium japonicum fegA* gene encodes an iron regulated outer membrane protein with similarity to hydroxamate-type siderophore receptors. *Journal of Bacteriology* 23:7265-7275.

Lynch D, O'Brien J, Welch T, Clarke P, Cuiv PO, Crosa JH and O'Connell M (2001) Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 183: 2576–2585.

Lodwig E and Poole P (2003) Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:37-78.

Martinez M, Ugalde RA and Almiron M (2005) Dimeric *Brucilla abortus* Irr protein controls its own expression and binds haem. *Microbiology* 151:3427–3433.

Massé E and Gottesman S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:4620-4625.

Massé E, Vanderpool CK and Gottesman S (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 6962–6971.

McHugh JP, Rodriguez-Quinones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE and Andrews SC (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* 278:29478–29486.

Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN and Martinez-Romero E (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 29:315–332.

Michiels J, Dombrecht B, Vermeiren N, Xi CW, Luyten E and Vanderleyden J (1998) *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *Microb Ecol* 26:193-205.

Miller JH (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Minamisawa K (1990) Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. *Plant Cell Physiol* 31:81-89.

Minamisawa K, Seki T, Onodera S, Kubota M and Asami T (1992) Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. *Appl Environ Microbiol* 58:2832–2839.

Moulin L, Munive A, Dreyfus B and Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948–950.

Neilands JB (1981) Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry* 50:715-731.

Neilands JB (1993) Siderophores. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1:1-3.

Neilands JB (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry* 270:26723-26732.

Nienaber A, Hennecke H and Fischer HM (2001) Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* 41:787–800.

Noya F, Arias A and Fabiano E (1997) Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. *Journal of Bacteriology* 179: 3076–3078

Oglesby AG, Murphy ER, Iyer VR and Payne SM (2005) Furregulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and ydeP. *Mol Microbiol* 58: 1354–1367.

Palyada K, Threadgill D and Stintzi A (2004) Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 186:4714–4729.

Pandey A, Bringek F and Meyer JM (1994) Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Applied and Microbiological Biotechnology* 40:735-739.

Park, S.-J. and Gunsalus, R.P. (1995) Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli* : Role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. *J. Bacteriol.* 177:6255-6262.

Patzer S I and Hantke K (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28:1199-1210

Patzer SI and Hantke K (2000) The Zinc-responsive Regulator Zur and Its Control of the *znu* Gene Cluster Encoding the ZnuABC Zinc Uptake System in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275:24321-24332.

Peres JRR (1979) Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill). Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Peres JRR and Vidor C (1980) Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em estirpes de soja. *Agron Sulriogradense* 16: 205-219.

Perret X, Staehelin C and Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180-201.

Phillips RW, Kovach ME, Bellaire BH, Baldwin CL, Elzer PH and Roop RM II (1997) Identification of the ferric uptake regulator (fur) homolog from *Brucella abortus*. GenBank accession number AFO23177.

Platero R, Peixoto L, O'Brian MR and Fabiano E (2004) Fur is involved in manganese-dependent regulation of *mntA* (*sitA*) expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* 70:4349–4355.

Plessner O, Klapatch T and Guerinot ML (1993) Siderophore utilization by *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* 59:1688–1690.

Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E and Vasil ML (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* 47:903–915.

Qi Z, Hamza I and O'Brian MR (1999) Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13056–13061.

Qi Z and O'Brian MR (2002) Interaction between the bacterial iron response regulator and ferrochelatase mediates genetic control of heme biosynthesis. *Mol Cell* 9:155–162.

Qian Y, Lee JH and Holmes RK (2002) Identification of a DtxR-regulated operon that is essential for siderophore-dependent iron uptake in *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* 184:4846–4856.

Ratledge, C and Dover, LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881-941.

Reigh G and O'Connell M (1993) Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 14:94-102.

Rivas R, Willems A, Subba-Rao N, Mateos P F, Dazzo F B, Martinez-Molina E, Gillis M and Velazquez E (2003) Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst Appl Microbiol* 26:47–53.

Rudolph G, Hennecke H and Fischer HM (2006) Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia. *FEMS Microbiology Reviews* 30:631-648.

Rumjanek NG, Berkum P and Triplett EW (1993) Common Soybean Inoculant Strains in Brazil are Members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl Environ Microbiol* 59:4371-4373.

Runyen-Janecky LJ and Payne SM (2002) Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. *Infect Immun* 70:4379–4388.

Sabri M, Leveille S and Dozois CM (2006) A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology* 152:745–758.

Saito I, Wormald MR and Williams RJP (1991) Some structural features of the iron-uptake regulation protein. *Eur. J. Biochem* 197:29–38.

Sambrook J and Russel DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schaffer S, Hantke K and Braun V (1985) Nucleotide sequence of the iron regulatory gene *fur*. *Mol. Gen. Genet* 201:204–212.

Schwartz CJ, Giel JL, Patschkowski T, Luther C, Ruzicka FJ, Beinert H and Kiley PJ (2001) IscR, an Fe–S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe–S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14895–14900.

Selosse MA, Baudoin E and Vandenkoornhuyse P (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327:639–648.

Simon R, Prierer U and Pühler AA (1983) A broad host range mobilisation system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784–791.

Somasegaram P and Hoben JH (1994) Handbook for Rhizobia: Methods in legume-*Rhizobium* technology. Springer-Verlag, New York, 450 pp.

Stanley J, Brown GG and Verma DP (1985) Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. *J Bacteriol* 163:148-154.

Stevens JB, Carter RA, Hussain H, Carson KC, Dilworth MJ and Johnston AWB (1999) The *fhu* genes of *Rhizobium leguminosarum* specifying siderophore uptake proteins: *fhuCDB* are adjacent to a pseudogene version of *fhuA*. *Microbiology* 145:593-601.

Stojiljkovic, I. and Hantke, K. (1995) Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Genet.* 247:199-205.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C and Dreyfus B (2001) Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* 183:214–220.

Tan G, Gao Y, Shi M, Zhang X, He S, Chen Z and An C (2005) SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res.* 33:e122.

Tas E, Saano A, Leinonen P and Lindstrom K (1995) Identification of *Rhizobium* spp. in peat-based inoculants by DNA hybridization and PCR and its application in inoculant quality control. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1822-1827.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acid. Res.* 25:4876-82.

Todd JD, Wexler M, Sawers G, Yeoman KH, Poole PS and Johnston AW (2002) RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 148:4059–4071.

Todd JD, Sawers G and Johnston AW (2005) Proteomic analysis reveals the wide-ranging effects of the novel, iron-responsive regulator RirA in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Mol Genet Genomics* 273: 197–206.

Todd JD, Sawers G, Rodionov DA and Johnston AWB (2006) The *Rhizobium leguminosarum* regulator IrrA affects the transcription of a wide range of genes in response to Fe availability. *Mol Genet Genomics* in press. d.o.i.: 10.1007/ s00438-006-0115-y

Touati, D (1988) Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, studied with operon and protein fusions. *J. Bacteriol.* 170:2511-2520.

Touati, D, Jacques M, Tardat B, Bouchard L and Despied S (1995) Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in Δfur mutants of *Escherichia coli* : Protective role of superoxide dismutase. J. Bacteriol 177:2305-2314.

Touati, D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. Arch. Biochem. Biophys. 373:1-6

Triplett EW and Sadowsky MJ (1992) Genetics of competition for nodulation of legume. Annual Review of Microbiology 46:399-428.

Trujillo ME, Willems A, Abril A, Planchuelo AM, Rivas R, Ludena D, Mateos PF, Martinez-Molina E and Velazquez E (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl Environ Microbiol 71:1318–1327.

Valverde A, Velazquez E, Fernandez-Santos F, Vizcaino N, Rivas R, Gillis M, Mateos PF, Martinez-Molina E, Igual JM and Willems A (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. Int J Syst Evol Microbiol 55:1985–1989.

Van Loon LC and Bakker PAHM (2003) Signalling in Rhizobacteria–Plant Interactions. Ecological Studies 168:297-330.

Vásquez-Arroyo J, Sessitsch A, Martínez E and Peña-Cabriaes JJ (1998) Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant Soil* 204:147-154.

Vassinova, N and Kozyruv, D (2000) A method for direct cloning of Fur-regulated genes: identification of seven new Fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146:3171-3182.

Viguiet CO, Cuiv P, Clarke P and O'Connell M (2005) RirA is the iron response regulator of the rhizobactin 1021 biosynthesis and transport genes in *Sinorhizobium meliloti* 2011. *FEMS Microbiol Lett* 246:235–242.

Vincent JM (1970) *Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford, Blackwell, 1970. 164pp.

Wee S, Neilands JB, Bittner ML, Hemming BC, Haymore BL and Seetharam R (1988) Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of *Escherichia coli* K-12. *Biol. Metals* 1:62–68.

Wexler M, Todd JD, Kolade O, Bellini D, Hemmings AM, Sawers G and Johnston W (2003) Fur is not the global regulator of iron uptake genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 149:1357–1365.

Willems A (2007) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* 287:3-14.

Willems A, Fernandez-Lopez M, Munoz-Adelantado E, Goris J, deVos P, Martinez-Romero E, Toro N and Gillis M (2003) Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. Int J Syst Evol Microbiol 53:1207–1217.

Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J and Fan H (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybean. Int J Syst Bacteriol 45:706-711.

Yang J, Ishimori K and O'Brian MR (2005) Two heme binding sites are involved in the regulated degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. J Biol Chem 280:7671–7676.

Yang J, Panek H and O'Brian MR (2006a) Oxidative stress promotes degradation of the Irr protein to regulate haem biosynthesis in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol Microbiol 60:209–218.

Yang J, Sangwan I, Lindemann A, Hauser F, Hennecke H, Fischer HM and O'Brian MR (2006b) *Bradyrhizobium japonicum* senses iron through the status of heme to regulate iron homeostasis and metabolism. Mol Microbiol 60:427–437.

Yeoman KH, Wisniewski-Dye F, Timoney C, Stevans JB, DeLuca NG, Downie JA and Johnston AWB (2000) Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene

fhuA: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of an *fhuA* pseudogene in different strains. *Microbiology* 146:829-837.

Yeoman KH, Curson AR, Todd JD, Sawers G and Johnston AW (2004) Evidence that the *Rhizobium* regulatory protein RirA binds to cis-acting iron-responsive operators (IROs) at promoters of some Fe-regulated genes. *Microbiology* 150:4065–4074.

Zheng L, Cash VL, Flint DH and Dean DR (1998) Assembly of iron-sulfur clusters- Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273:13264-13272.

Zheng M, Doan B, Schneider TD and Storz G (1999) OxyR and SoxRS regulation of fur. *J. Bacteriol.* 181:4639-4643.

7.1. Fontes de internet:

NCBI - National Center for Biotechnology Information. [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (Janeiro 23, 2008).

Softberry - <http://www.softberry.com>

QIAGEN - <http://www1.qiagen.com/Plasmid/BacterialCultures.aspx?>

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](#)