

Titulo: **Análise funcional de factor transcricional ortólogo do NorR em *D. gigas*.**

Introdução:

As bactérias redutoras de sulfato constituem um grupo diversificado de procariontes. Estas bactérias utilizam o sulfato como aceitador final de electrões e obtêm a energia para o seu crescimento a partir da oxidação de compostos orgânicos e de hidrogénio [1,2]. O sulfato é termodinamicamente estável e a forma mais abundante de enxofre na biosfera, sendo a redução de sulfato a base do ciclo de enxofre no ambiente [3].

Além do seu papel importante no ciclo de enxofre, as bactérias redutoras de sulfato contribuem ainda para a regulação de vários processos nos solos, incluindo reciclagem de matéria orgânica, biodegradação de poluentes aromáticos clorados em solos anaérobios e sedimentos, bem como na metilação de mercúrio [4, 5, 6].

A bactéria *Desulfovibrio gigas* é importante tanto ao nível ecológico, por pertencer ao género das bactérias responsáveis pela reciclagem de matéria orgânica, como a nível económico, por estar envolvida na corrosão de estruturas metálicas em ambientes aquáticos e terrestres. Estas bactérias possuem mecanismos de protecção contra as espécies de nitrogénio existentes em diferentes estados de redox formando o ciclo biogeoquímico do nitrogénio. A resposta ao óxido nítrico (NO) é de grande importância visto que se trata de um intermediário obrigatório do ciclo do nitrogénio. Com efeito, estas bactérias podem utilizar os óxidos de nitrogénio, nitrito e nitrato, como aceptadores terminais de electrões para o oxigénio – condições limitantes sob condições anaeróbicas. Durante a respiração por nitrato, a formação de compostos comuns intermediários ocorre mas termina com diferentes produtos como a amónia, gases de óxido de nitrogénio ou de dinitrogénio.

A presença de mecanismos de protecção contra o NO em espécies de *Desulfovibrio* levanta a possibilidade de que estes organismos façam frente ao stress nitrosativo no seu meio ambiente. Podem efectivamente ter que detoxificar o NO formado e libertado no processo da redução dos nitritos por coexistirem com organismos desnitrificantes. Compreender estes mecanismos é de enorme relevância estando subjacente a estes mecanismos a compreensão das redes transcricionais e assim compreender os processos celulares da bactéria *Desulfovibrio gigas* [7,8].

Estes mecanismos não são conhecidos nas proteobactérias, contudo sabe-se que em *E. coli* e *R. eutropha* existe um factor transcricional que responde ao NO, σ^{54} -NorR, que revelou activar a expressão das NO-redutases *norVW* e *norAB* de *E. coli* e *norAB* de *R. eutropha* respectivamente [9,10].

Neste laboratório já foram removidos os genes codificantes para a rubradoxin:oxigen oxiredutase (ROO), que é a última proteína numa cadeia de transferência de electrões

citoplasmática que acopla a oxidação de NADH com a redução de oxigénio a água, técnicas que exigem a transformação das bactérias com uma cassette contendo as regiões flanqueadoras do gene a deletar e o gene reporter que substitui este. O facto que o gene *roo* contém duas sequências [GT-(N₇)-AC] a montante do discistrão *rd-roo* sugere que o gene possa ser regulado por um órtologo do factor transcricional NorR [11]

Refererências Introdução

- [1] Devereux, R., He S.H., et al. (1997), Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family, J. Bacteriol, **172**(7): 3609-3619.
- [2] Postgate, J. (1994), The sulphate-reducing bacteria, Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge.
- [3] Widdel, H. (1992), The Dissimilatory Sulfate- and Sulphur-Reducing Bacteria, A. Balows, Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K., New York, Springer-Verlag, **1**.
- [4] Barton, L. L., Tomei, F. (1995), Characteristics and Activities of Sulfate-Reducing Bacteria, Sulfate-Reducing Bacteria, L. L. Barton, New York, Plenum Press, **8**.
- [5] Fauque, G. (1995), Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria, Sulfate-Reducing Bacteria, L. L. Barton, New York, Plenum Press, **8**.
- [6] Castro, H. F., Williams N.H. (2000), Phylogeny of Sulfate-Reducing Bacteria(1), FEMS Microbiol Ecol, **31**, 1-9.
- [7] Loubinoux, J., Valente, F.M., Pereira, I.A., Costa, A., Grimont, P.A. and Le Faou, A.E. (2002) Int J Syst Evol Microbiol 52, 1305-8.
- [8] Gibson, G.R., J. H. Cummings, and G. T. McFarlane FEMS Microbiol. Ecol., 1991. 86: p. 103-112. (1991) FEMS Microbiol. Ecology 86, 103-112.
- [9] Tucker, N.P., D'Autreaux, B., Studholme, D.J., Spiro, S. and Dixon, R. (2004) J Bacteriol 186, 6656-60.
- [10] Pohlmann, A., Cramm, R., Schmelz, K. and Friedrich, B. (2000) Mol Microbiol 38, 626-38.
- [11] Rodrigues, R., Vicente, J. B., et al (2006), *Desulfovibrio gigas* Flavodiiron Protein Affords Protection against Nitrosative Stress in vivo, J. Bacteriol, **188**, 2745-51.

Objectivos

Este trabalho tem assim como objectivo contribuir para o estudo da regulação da expressão dos genes ROO através da identificação dos factores de transcrição

potencialmente envolvidos nessa regulação. Foi identificada uma família de genes codificando para o factor transcricional NorR no genoma da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio gigas*.

Tarefa 1 Clonagem e sequenciação do gene *norR* in *D. gigas*.

O *norR* hipotético de *D. gigas* será clonado num vector de expressão pFLAG-CTC (SIGMA), e o plasmídeo resultante será usado para transformar *E. coli norR* mutant strain, na qual a indução pelo stress nitrosativo do homólogo ROO é abolida [1].

A estirpe mutante superexpressando *D.gigas NorR* sera analisado na presença de quer NO ou GSNO, como descrito em [2].

Tarefa 2- Construcção da cassette de disrupção para deleccção do gene NorR

Será construída uma cassette contendo as regiões flanqueantes do gene *norR* contendo o reporter canamicina *Kn^R* no plasmídeo pJRD215 com a finalidade de eliminar o ortólogo em *D.gigas* de *norR*. Serão escolhidos os primers de molde a tornar a cassette específica. Esta construção sera utilizada para transformer *D. gigas* por electroporação [1,2].

Tarefa 3- Deleccção do gene *norR*

A deleccção será levada a cabo por recombinação homóloga com o DNA genómico de *D. gigas* conduzindo à substituição da região a ser deletada pela cassette de disrupção acima referida [1,2].

Afim de verificar a disrupção do gene fazer-se-ão vários testes entre os quais se extrai o DNA de *D.gigas* e dos respectivo mutante que será hidrolizado com enzimas de restrição, feita a transferência para papel de nitrocelulose que será em seguida hibridado com a sonda do gene marcada radioactivamente com ATP[P³²]

Tarefa 4- Caracterização do mutante *norR* de *D. gigas*

O crescimento do mutante *nroR* será avaliado quer na presença de NO como do agente nitrosativo GSNO, como descrito em [1].

As células crescem em condições anaerobicas a 37 ° no meio lactate/sulfato até á fase precoce de crescimento exponencial (OD600nm~0.3-0.4). Quando necessário 10 mM NO ou 10 mM GSNO sera adicionado às culturas sendo o crescimento monitorizado lendo OD600nm [1,4].

Referências (técnicas)

- [1] Rodrigues, R., Vicente, J.B., Felix, R., Oliveira, S., Teixeira, M. and Rodrigues-Pousada, C. (2006) *J Bacteriol* 188, 2745-51.
- [2] Broco, M., Rousset, M., Oliveira, S. and Rodrigues-Pousada, C. (2005) *FEBS Lett* 579, 4803-7.
- [3] Busch, A., Strube, K., Friedrich, B. and Cramm, R. (2005) *Biochem Soc Trans* 33, 193-4.
- [4] Rodrigues, R., Valente, F.M., Pereira, I.A., Oliveira, S. and Rodrigues-Pousada, C. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 306, 366-75.