

459

ANÁLISE DA REGIÃO REGULATÓRIA DO OPERON NIFUSV DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE. Débora Broch Trentini, Fernando Hayashi Sant'anna, Irene Silveira Schrank (orient.) (UFRGS).

O gênero *Azospirillum* comporta bactérias com a capacidade de promover o crescimento vegetal pela produção de fitormônios e fixação do nitrogênio. A fixação do nitrogênio é realizada por um complexo enzimático denominado nitrogenase, que depende da ativação coordenada de diversos genes, denominados *nif* e *fix*. Entre eles encontram-se os genes *nifUSV*, que estão envolvidos no processamento do cofator necessário à nitrogenase. Devido ao alto custo energético para a célula bacteriana, existem diferentes níveis de regulação do processo de fixação. A proteína NifA regula a transcrição dos genes envolvidos de acordo com os níveis de oxigênio e nitrogênio intracelular. Na região a montante do operon *ORF2nifUSVORF4* de *A. brasilense*, há um sítio de ligação à proteína NifA e um promotor σ^{54} . Para avaliar a atividade desse promotor em relação a promotores de outros operons *nif/fix*, foi construída uma quimera (pnifU::lacZ) no vetor pMC1403, que permite o monitoramento *in vivo* da atividade de regiões regulatórias pela fusão do promotor a ser testado com o gene repórter *lacZ*. O plasmídeo recombinante foi transformado na linhagem de *E. coli* MC1061, contendo ou não o plasmídeo pCK3, o qual expressa constitutivamente a proteína NifA de *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, mesmo na ausência de pCK3, houve atividade da enzima β -galactosidase. Analisando a seqüência clonada pelo programa Promoter Prediction, foi encontrado um provável promotor σ^{70} . A seqüência regulatória do operon *ORF2nifUSVORF4* foi mutagenizada pela metodologia de megaprimer para impedir a funcionalidade deste promotor σ^{70} fortuito. Está em andamento a clonagem do produto da mutagênese no plasmídeo pMC1403 para posterior análise comparativa aos promotores de *nifHDK* e *fixABCX*, através de ensaios de atividade da β -galactosidase. (PIBIC).