

A NECESSIDADE DA PROTEÍNA NIFA PARA A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR DO OPERON *nifENXorf3* DE *Azospirillum brasilense* Sp7. Tatiana A. B. Bressel, Deise P. Potrich, Carlos A. G. Blaha, Luciane M. P. Passaglia, Irene S. Schrank. (Instituto de Biociências, UFRGS)

O foco central de todo o processo de controle da fixação do nitrogênio em função das condições ambientais, recai sobre a ativação da transcrição dos genes que codificam os componentes protéicos que tomarão parte, direta ou indiretamente, da redução do nitrogênio molecular. Isto é feito por uma RNA polimerase associada à um fator sigma alternativo, denominado sigma 54, que se liga ao consenso -24(GG)/-12(GC) existente em promotores de muitos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio. O fundamental é que o promotor sigma 54, combinado com a RNA polimerase, por si só não é capaz de promover a transcrição dos genes relacionados à fixação do nitrogênio. Ele precisa de um outro componente capaz de organizar um complexo de transcrição realmente funcional, a proteína NifA. Esta proteína é um elemento central porque sobre ela incide toda uma cascata sinalizatória que justamente sente as condições ambientais existentes na célula. A proteína NifA se liga ao DNA numa região ativadora denominada UAS. A expressão *in vivo* da atividade das regiões promotoras tem sido realizada pela fusão entre a região promotora e diferentes genes “reporter”, sendo um exemplo o gene *lacZ*. Em *Azospirillum brasilense* fusões na região promotora dos operons *nifHDKorf1Y* e *orf2nifUSVorf4* com o gene *lacZ* foram obtidas. Neste trabalho demonstramos a fusão da região promotora do operon *nifENXorf3* com o gene reporter *lacZ*. Para isto, a região promotora foi isolada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), gerando um fragmento de DNA de 590 pares de bases e clonada no vetor pMC1403. Para testar a necessidade da proteína NifA na ativação da transcrição, o plasmídeo denominado pMCE foi transformado em linhagens de *Escherichia coli* MC1061 contendo o plasmídeo pCK3, o qual expressa a proteína NifA de *K. pneumoniae* constitutivamente. Foi usado como controle negativo a mesma linhagem bacteriana sem o plasmídeo pCK3 na transformação. Através destes experimentos foi possível demonstrar que o promotor do operon *nifENXorf3* somente ativa a transcrição do gene *lacZ* na presença de NifA.