

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANO ALVES STEFANELLO

MUTAGÊNESE E ANÁLISE FUNCIONAL DO DOMÍNIO N-TERMINAL DE
Herbaspirillum seropedicae

CURITIBA

2011

ADRIANO ALVES STEFANELLO

MUTAGÊNESE E ANÁLISE FUNCIONAL DO DOMÍNIO N-TERMINAL DE
Herbaspirillum seropedicae

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Biologia (BIO027) como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas (Manhã) – Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Prof^a Rose Adele Monteiro, pela disposição e paciência para orientar o meu trabalho ao longo de toda a minha Iniciação Científica.

Agradeço também aos professores Emanuel Maltempi de Souza e Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN), e a todos os demais integrantes do NFN pelo apoio constante ao longo desses anos.

Aos colegas de laboratório (todos eles), meu especial agradecimento pela paciência e pelo auxílio com as técnicas novas que eu tive que aprender (inclusive as técnicas de lavagem de vidraria e limpeza de bancadas). Agradeço especialmente ao Marco Kadowaki e ao Marco Aurélio, que me ajudaram muito no começo e no final da minha IC, respectivamente.

Agradeço ao Bruno Aquino pela construção das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* contendo a fusão cromossomal *nifH::lacZ*.

Por fim, agradeço às agências financiadoras pela bolsa concedida (PIBIC-CNPq) e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto (Institutos do Milênio e Fundação Araucária).

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae (β -Proteobacteria) é um diazotrofo encontrado em associação com gramíneas de interesse econômico, como milho e cana-de-açúcar. A fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* é controlada a nível transcricional pela proteína NifA, que possui três domínios modulares característicos dos ativadores transcricionais dependentes de σ^{54} : um domínio N-terminal regulatório, um domínio central catalítico, e um domínio C-terminal de ligação ao DNA. Há também um interdomínio Q e um interdomínio ID, que conectam os domínios N-terminal e central e os domínios central e C-terminal, respectivamente. NifA é inativa sob alta concentração de nitrogênio fixado, e essa sensibilidade é atribuída ao domínio N-terminal, uma vez que a proteína NifA N-truncada permanece ativa em concentrações de amônio inibitórias para a proteína intacta. A sensibilidade a amônio é atribuída à interação do domínio N-terminal de NifA com a proteína GlnK, uma vez que a estirpe *glnK* de *H. seropedicae* é incapaz de fixar nitrogênio, e esse fenótipo é revertido pela expressão de NifA N-truncada. No presente trabalho, foram construídas variantes do gene *nifA* codificando proteínas truncadas nos aminoácidos 45, 90, 135, 165, 185, 203, 218, e 244 (denominadas proteínas N45, N90, N135, N165, N185, N203, N218 e N244), e variantes contendo reduções no comprimento de interdomínio Q, (denominadas CC, CC1, CC2, e CC3). A atividade dessas variantes foi testada em *E. coli* e *H. seropedicae* a partir de vetores contendo promotores adequados para sua expressão. A atividade das variantes em *Escherichia coli* (estirpes JM109 e ET8000) foi medida como a capacidade de ativar uma fusão *nifH::lacZ*, detectada no ensaio de β -galactosidase. N165 e N185 foram ativas em *E. coli* e não-reguladas por amônio, ao passo que as demais construções foram todas inativas. As mesmas proteínas foram expressas em *Herbaspirillum seropedicae* *nifA*⁻ e *glnK*, e sua atividade foi determinada através de ensaios de atividade da β -galactosidase e atividade da nitrogenase. As proteínas N165 e N185 apresentaram atividade não-regulada nas duas linhagens testadas, demonstrando sua independência de GlnK. As demais proteínas, exceto N45, permaneceram inativas em *H. seropedicae*, sugerindo que são totalmente disfuncionais (muito provável no caso de N221 e N244) ou permanentemente inibidas por seus domínios N-terminais. N45 mostrou-se parcialmente ativa em *H. seropedicae* *glnK*, sugerindo que ela interage com GlnK de maneira inibitória, ou que é capaz de formar heterohexâmeros intrinsecamente ativos com NifA selvagem no mutante *glnK*.

Palavras chave: NifA, *Herbaspirillum seropedicae*, Fixação Biológica do Nitrogênio

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae (β -Proteobacteria) is a diazotroph found associated with important gramineous crops, such as corn and sugar cane. Nitrogen fixation in this organism is mainly controlled by the σ^{54} -dependent transcriptional activator NifA, a modular protein comprising three domains: an N-terminal domain with regulatory function, a central ATPase domain, and a C-terminal DNA-binding domain. Those domains are connected by a Q-linker and an ID-linker, respectively. NifA is inactive under high levels of fixed nitrogen and its N-terminal domain is involved in this inhibition, since an N-truncated form of NifA is active in *H. seropedicae nifA*⁻ independent of ammonium levels. Furthermore, the relief of inhibition is likely to happen through the interaction of the N-terminal domain with GlnK, since *glnK* mutants of *H. seropedicae* are unable to fix nitrogen and this phenotype can be reverted by expression of N-truncated NifA. In the present work, we have constructed *nifA* gene variants coding for 7 new variants of *H. seropedicae* NifA protein truncated at distinct position of the N-terminus (called N45, N90, N135, N165, N185, N221, and N244, based on their first aminoacids) and 4 variants bearing truncated Q-linkers (named CC, CC1, CC2, CC3, and CC4). Their activity was tested in *E. coli* and *H. seropedicae* background. Activation of a *nifH::lacZ* fusion in *E. coli* JM109 and ET8000 has shown that proteins N165 and N185 were fully active and not regulated by ammonium, and the remaining other constructions were inactive. The same proteins were expressed in *H. seropedicae nifA*⁻ and *glnK*⁻, and their activity was assessed through β -galactosidase and nitrogenase assays. N165 and N185 were active and not regulated in both mutants, showing their independence from GlnK. All the other constructions, except N45, were inactive in *H. seropedicae*, suggesting that they might be completely dysfunctional (this seems very likely to be true for N221 and N244) or permanently inhibited by their truncated N-terminus. N45 showed a small activity in *H. seropedicae glnK*⁻, detectable only on nitrogenase activity assays; this might be due to a possible inhibitory interaction between N45 and GlnK, or due to the formation of heterooligomers with native NifA in the *glnK* mutant.

Keywords: NifA, *Herbaspirillum seropedicae*, Biological Nitrogen Fixation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

FIGURA 1	- Controle do estado de uridilação de PII por GlnD.....	5
FIGURA 2	- Mecanismo geral de controle do metabolismo de nitrogênio em proteobactérias..	7
FIGURA 3	- Organização dos principais genes <i>nif</i> de <i>H. seropedicae</i>	9
FIGURA 4	- Representação esquemática de NifA de <i>H. seropedicae</i>	11
FIGURA 5	- Regulação de NifA de <i>H. seropedicae</i>	14
FIGURA 6	- Representação esquemática do gene <i>nifA</i> mostrando o anelamento dos primers 5' (na parte inferior da figura) e dos primers 3' (na porção superior).....	24
FIGURA 7	- Representação esquemática das ampliações de variantes do gene <i>nifA</i>	30
FIGURA 8	- Amplificações de variantes 5'-truncadas do gene <i>nifA</i> a partir do plasmídeo pRAM1.....	31
FIGURA 9	- Representação esquemática da amplificação de fragmentos do gene <i>nifA</i>	31
FIGURA 10	- Amplificações de fragmentos do gene <i>nifA</i> a partir do plasmídeo pRAM1.....	32
FIGURA 11	- Amplificações de variantes do gene <i>nifA</i> a partir das ligações de HsnifA1-N a (CC, CC1, CC2, e CC3)-HsnifA2A.....	33
FIGURA 12	- Esquematização das variantes de NifA analisadas nesse trabalho, enfatizando os domínios modulares.....	34
FIGURA 13	- Representação esquemática dos procedimentos de clonagem.....	35
FIGURA 14	- Vizinhança do gene <i>nifA</i> nos plasmídeos construídos.....	36
FIGURA 15	- Clonagem das variantes do gene <i>nifA</i> em vetor pT7-7.....	36
FIGURA 16	- Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pT7-7 contendo variantes do gene <i>nifA</i>	37
FIGURA 17	- Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pT7-7 contendo variantes do gene <i>nifA</i>	28
FIGURA 18	- Alinhamento de <i>nifA</i> e das variantes CC, CC1, CC2, e CC3 no programa MEGA5.....	28
FIGURA 19	- Subclonagem das variantes de <i>nifA</i> em vetor para expressão em <i>E. coli</i>	29
FIGURA 20	- Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pET28a contendo variantes do gene <i>nifA</i>	29
FIGURA 21	- Subclonagem das variantes de <i>nifA</i> em vetor para expressão em <i>E. coli</i>	40
FIGURA 22	- Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pTZ18R contendo variantes do gene <i>nifA</i>	40
FIGURA 23	- Subclonagem das variantes de <i>nifA</i> em vetor para expressão em <i>H. seropedicae</i>	41
FIGURA 24	- Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pLAFR3.18 contendo variantes do gene <i>nifA</i>	41
FIGURA 25	- Subclonagem das variantes de <i>nifA</i> em vetor para expressão em <i>H. seropedicae</i>	42

FIGURA 26	- Representação das duas orientações possíveis do inserto clonado com XbaI no vetor pDK6pnifA.....	43
FIGURA 27	- Restrição dos clones das variantes de <i>nifA</i> em pDK6pnifA com XbaI (géis superiores) e com PstI (géis inferiores).....	44
FIGURA 28	- Restrição dos clones das variantes de <i>nifA</i> em pLAFR3.18(pnifA) com SacI e HindIII.....	45
FIGURA 29	- Atividade de β -galactosidase das variantes de NifA expressas a partir de pT7-7 em <i>E. coli</i> JM109 pRT22.....	46
FIGURA 30	- Gel SDS-PAGE de extratos de <i>E. coli</i> JM109 pRT22 expressando variantes de NifA a partir do plasmídeo pT7-7.....	47
FIGURA 31	- Gel SDS-PAGE de extratos de <i>E. coli</i> JM109 pRT22 expressando variantes de NifA a partir do plasmídeo pT7-7. As células foram cultivadas em 0% O ₂ e 0 mM de NH ₄ Cl.....	48
FIGURA 32	- Atividade de β -galactosidase de variantes de NifA expressas a partir de pET28a em <i>E. coli</i> JM109 pRT22.....	50
FIGURA 33	- Atividade de β -galactosidase de variantes de NifA expressas a partir de pTZ18R em <i>E. coli</i> ET8000 pRT22.....	51
FIGURA 34	- Gel SDS-PAGE de extratos de <i>E. coli</i> ET8000 pRT22 expressando variantes de NifA a partir do plasmídeo pTZ18R.....	52
FIGURA 35	- Atividade da nitrogenase de <i>H. seropedicae</i> SmR54 (<i>nifA</i> ⁻) e LNglNkdel (<i>glnK</i>) expressando variantes de <i>nifA</i> a partir do vetor pLAFR3.18.....	54
FIGURA 36	- Amplificação do gene 16S de culturas de <i>H. seropedicae</i> SmR54 e LNglNkdel....	55
FIGURA 37	- Restrição do gene 16S de culturas de <i>H. seropedicae</i> SmR54 e LNglNkdel.....	55
FIGURA 38	- Atividade da nitrogenase de <i>H. seropedicae</i> SmR54 (<i>nifA</i> ⁻) e LNglNkdel (<i>glnK</i>) expressando variantes de <i>nifA</i> a partir do vetor pLAFR3.18(pnifA).....	56
FIGURA 39	- Modelo de regulação de NifA com duas interações inibitórias.....	57
FIGURA 40	- Modelo de formação de heterooligômeros ativos de NifA e N45.....	59
FIGURA 41	- Amplificação do gene 16S de culturas de <i>H. seropedicae nifA</i> ⁻ e <i>glnK (nifH::lacZ)</i>	60
FIGURA 42	- Restrição do gene 16S de culturas de <i>H. seropedicae nifA</i> ⁻ e <i>glnK (nifH::lacZ)</i>	61
FIGURA 43	- Atividade de β -galactosidase de variantes de NifA expressas a partir de pLAFR3.18(pnifA) em <i>H. seropedicae nifA</i> ⁻ <i>nifH::lacZ</i>	62
FIGURA 44	- Atividade de β -galactosidase de variantes de NifA expressas a partir de pLAFR3.18(pnifA) em <i>H. seropedicae glnK nifH::lacZ</i>	63
FIGURA 45	- Modelo de regulação de NifA por interação entre GlnK e o domínio N-terminal....	64
FIGURA 46	- Alinhamento das seqüências de 13 proteínas NifA de proteobactérias, mostrando a conservação dos aminoácidos G137 e L139.....	65
FIGURA 47	- Alinhamento das seqüências de 13 proteínas NifA de proteobactérias, mostrando a conservação do aminoácido L41.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	16
TABELA 2	- DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i> E <i>H. seropedicae</i>	20
TABELA 3	- MEIO NFDM.....	21
TABELA 4	- ANTIBIÓTICOS.....	21
TABELA 5	- PRIMERS DESENHADOS E SINTETIZADOS PARA USO NESSE TRABALHO..	23
TABELA 6	- DESENHADOS EM TRABALHOS ANTERIORES.....	24
TABELA 7	- SISTEMA DE REAÇÃO E PROGRAMA PARA AMPLIFICAÇÃO DE 16S.....	25
TABELA 8	- GEL DE POLIACRILAMIDA 12% DESNATURANTE.....	29
TABELA 9	- SISTEMA DE REAÇÃO E PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAM VARIANTES DE NifA.....	30
TABELA 10	- SISTEMA DE REAÇÃO E PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAM O DOMÍNIO N- TERMINAL E AS VARIANTES DOS DOMÍNIOS CENTRAL+C-TERMINAL.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	1
1.1.1. Nitrogenase e genes <i>nif</i>	1
1.2. METABOLISMO DE NITROGÊNIO	2
1.2.1. Assimilação de amônio	3
1.2.2. Regulação global do metabolismo de nitrogênio pelo sistema <i>Ntr</i>	4
1.3. <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i>	8
1.3.1. Regulação da FBN em <i>H. seropedicae</i>	9
1.4. PROTEÍNA NIFA	10
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. REAGENTES	17
4.2. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	17
4.3. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	21
4.4. ANTIBIÓTICOS	22
4.5. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> ELETROCOMPETENTE	23
4.6. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> QUIMIOCOMPETENTE	23
4.7. TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO	23
4.8. ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	24
4.8.2. Análise da seqüência do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i>	24
4.8.3. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores	24
4.9. AMPLIFICAÇÃO DO DNA	25
4.9.1. Amplificação dos fragmentos codificantes para as proteínas N45, N90, N135, N165, N185, N203, N218, e N244	25
4.9.2. Amplificação dos fragmentos codificantes para as proteínas CC, CC1, CC2, e CC3	26
4.9.3. Amplificação do gene 16S a partir de cultura de <i>H. seropedicae</i>	26
4.10. SEQÜENCIAMENTO DO DNA	26
4.11. MANIPULAÇÃO DO DNA	27
4.11.1. Digestão com endonucleases de restrição	27
4.11.2. Ligaçã	27
4.11.3. Extração de DNA plasmidial	27
4.11.4. Análise eletroforética dos fragmentos de DNA	27
4.11.5. Purificação de fragmentos de DNA extraídos de gel de agarose	27
4.11.6. Preparação dos vetores para ligaçã	28
4.11.7. Quantificação de DNA por espectrofotometria	28
4.12. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE EM <i>E. COLI</i>	28
4.13. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE EM <i>H. SEROPEDICAE</i>	28
4.13.1. Atividade de β -galactosidase em diferentes concentrações de oxigênio	29
4.14. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>H. SEROPEDICAE</i>	29
4.15. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	29
4.16. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)	30
5. RESULTADOS	31
5.1. AMPLIFICAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE <i>NIFA</i>	31
5.2. CLONAGEM DAS VARIANTES DE <i>NIFA</i> EM VETORES DE EXPRESSÃO	36
5.2.1. Clonagem das variantes de <i>nifA</i> em vetor pT7-7	37
5.2.2. Subclonagem das variantes de <i>nifA</i> em vetor pET28a	39

5.2.3.	<i>Subclonagem das variantes de nifA em vetor pTZ18R</i>	40
5.2.4.	<i>Subclonagem das variantes de nifA em vetor pLAFR3.18</i>	41
5.2.5.	<i>Subclonagem das variantes de nifA à jusante do promotor nifA</i>	43
5.3.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS VARIANTES DE NIFA EM <i>E. COLI</i>	46
5.3.1.	<i>Atividade de β-galactosidase em E. coli JM109 pRT22</i>	47
5.3.2.	<i>Atividade de β-galactosidase em E. coli ET8000 pRT22</i>	51
5.4.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS VARIANTES DE NIFA EM <i>H. SEROPEDICAE</i>	54
5.4.1.	<i>Atividade de nitrogenase de H.seropedicae nifA⁻ e glnK complementados com as variantes de nifA</i>	54
5.4.2.	<i>Atividade de β-galactosidase em H. seropedicae nifA⁻, glnK, e nifA⁻ glnK</i>	61
6.	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

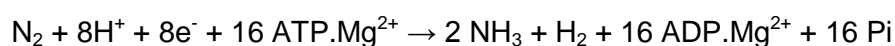
O gás nitrogênio compõe cerca de 78% da atmosfera terrestre, mas não é assimilável pela maioria dos organismos devido a sua baixa reatividade (KIM e REES, 1994). Apenas alguns organismos procarióticos (denominados diazotrofos) são capazes de converter o nitrogênio gasoso (N₂) a amônia (NH₃), um produto de mais fácil assimilação metabólica (RAYMOND *et al.*, 2004). Essa reação, denominada Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (BURRIS, 1991).

A FBN é responsável por cerca de 50 – 60% de todo o nitrogênio fixado anualmente na terra (KIM e REES, 1994; VITOUSEK *et al.*, 1997), sendo um processo vital para a manutenção do ciclo do nitrogênio. Também é vista com interesse por suas aplicações na agricultura, pois o nitrogênio é um nutriente limitante nos solos cultivados (DIXON e KAHN, 2004), particularmente no Brasil e outros países tropicais, onde a lixiviação provocada pelas chuvas sazonais é um fator importante para a perda do nitrogênio do solo (DOBEREINER, 1997). A deficiência de nitrogênio é geralmente suprida com o uso de fertilizantes contendo amônio produzido pelo processo de Haber-Bosch (CREWS e PEOPLES, 2004), que requerem alto consumo de energia para sua produção (KIM e REES, 1994), e cuja aplicação têm sérias implicações ambientais (CREWS e PEOLPLES, 2004; DIXON e KAHN, 2004; GILLER e CADISCH, 1995). Nesse cenário, perspectivas de expansão do uso de FBN na agricultura representam um avanço considerável em direção à sustentabilidade (GILLER; CADISCH, 1995), devido ao baixo custo financeiro e ambiental em relação ao processo industrial.

A eficiência do uso de FBN na agricultura é comprovada por muitos exemplos bem-sucedidos, particularmente com bactérias do gênero *Rhizobium* associadas a leguminosas; de fato, a FBN é em grande parte responsável pelo sucesso das lavouras de soja nos últimos anos no Brasil (DOBEREINER, 1997). Não se deve esquecer, porém, o aumento de produtividade de culturas de cereais e outras gramíneas cultivadas na presença de diazotrofos associativos (BALDANI *et al.*, 1987; BODDEY *et al.*, 1995; KAPULNIK *et al.*, 1983).

1.1.1. Nitrogenase e genes *nif*

A estequiometria da reação de redução do dinitrogênio a amônia foi determinada por Simpson e Burris (1984), que propuseram a equação abaixo para explicar o processo:



A redução do dinitrogênio tem um alto custo energético para a célula (16 mols de ATP para cada mol de N₂ reduzido). Além de dispendiosa, a reação é bastante lenta, com *turnover* de ~5 segundos (DIXON e KAHN, 2004), e só pode ocorrer na ausência de oxigênio, devido à sensibilidade do cofator de Ferro-molibdênio (FeMoco) da nitrogenase (SHAH e BRILL, 1977). Por fim, a fixação biológica de nitrogênio requer grande concentração da enzima nitrogenase (10 – 20% do total de proteína celular). Por todos esses fatores, a fixação biológica de nitrogênio é estritamente regulada em todos os organismos diazotrofos (MA e LUDDEN, 2001).

O complexo enzimático da nitrogenase é formado por duas metaloproteínas distintas: a proteína Fe (NifH), ou dinitrogenase redutase, e a proteína FeMo, ou dinitrogenase (NifDK) (HOWARD e REES, 1996), codificadas pelo operon *nifHDK*. A atividade catalítica é exclusiva da proteína FeMo, mas é dependente da redução de FeMo pela proteína Fe (BURRIS, 1991).

Embora os genes *nifHDK* sejam bastante conservados, a capacidade de fixar nitrogênio está presente em organismos filogeneticamente muito distantes como proteobactérias, cianobactérias e arqueias (RAYMOND et al., 2004; ZEHR et al., 2003), e a regulação do processo de fixação ocorre através de mecanismos distintos (DIXON e KAHN, 2004). Sugere-se que essa distribuição filogenética esparsa dos genes *nif* seja resultado da perda de genes *nif* presentes em um ancestral metanogênico, seguida de transferência horizontal de genes para linhagens bacterianas (RAYMOND et al., 2004; ZEHR et al., 2003).

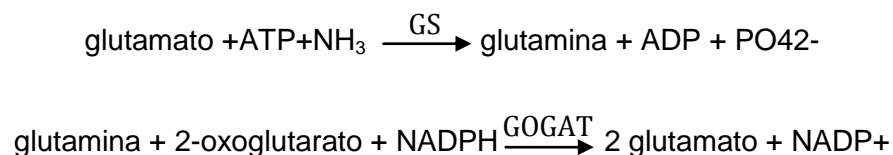
Os genomas de todos os diazotrofos contêm também genes que codificam outras proteínas necessárias à maturação da nitrogenase, especialmente no tocante à produção de seu cofator de Ferro-molibdênio (DIXON e KAHN, 2004; RAYMOND et al., 2004). Esse conjunto de genes recebeu a designação de genes *nif* (nitrogen fixation). Os genes *nif* têm expressão controlada em todos os organismos diazotróficos, e esse controle garante que a expressão da nitrogenase só ocorrerá em condições favoráveis à fixação de nitrogênio.

1.2. METABOLISMO DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é o terceiro elemento mais abundante presente nas células, e freqüentemente é limitante para o crescimento microbiano. A regulação adequada de seu metabolismo é de grande importância para maximizar o crescimento sob diferentes disponibilidades desse elemento (ARCONDÉGUY et al., 2001). O metabolismo de nitrogênio é o conjunto de reações efetuadas pela célula para assimilar nitrogênio do meio e incorporá-lo a estruturas celulares (MERRICK e EDWARDS, 1995). Mesmo considerando a diversidade de compostos nitrogenados passíveis de utilização disponíveis no ambiente (como exemplo, vide BRUHN et al., 1987) e sintetizados pela célula, algumas vias comuns são utilizadas por todas as bactérias para a execução dessas duas tarefas essenciais.

1.2.1. Assimilação de amônio

O amônio (NH_4^+) é a molécula preferencial para a obtenção de nitrogênio em bactérias (MERRICK e EDWARDS, 1995), e o composto comum a muitas rotas de assimilação de compostos nitrogenados; nitrato, nitrito, e compostos orgânicos devem primeiramente ser convertidos em amônio para poderem ser aproveitados (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). O amônio é também o produto final da reação de redução do dinitrogênio catalisada pelo complexo da nitrogenase (SIMPSON e BURRIS, 1984) nos organismos diazotróficos. Além disso, o amônio ocupa um importante lugar no monitoramento da concentração intracelular de nitrogênio, que é determinante para a mudança do metabolismo de alto para baixo nitrogênio (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). Sua incorporação ao metabolismo celular ocorre com a transferência do nitrogênio da molécula de amônio para uma molécula de 2-oxoglutarato, gerando como produto final glutamato. A reação é catalisada em duas etapas pelas enzimas glutamina-sintetase (GS, ou GlnA) e glutamato sintetase (GOGAT), conforme mostrado abaixo:



Em *E. coli*, a primeira etapa é inibida pela adenililação da proteína GlnA em resposta a altas concentrações de nitrogênio fixado (BROWN *et al.*, 1971); em outros organismos, a modificação da atividade ocorre por ADP-ribosilação (LIU e KAHN, 1995; MERRICK e EDWARDS, 1995; WOEHLER *et al.*, 1990). A proteína GlnA é um dodecâmero, cujos 12 monômeros podem ser modificados independentemente (WOEHLER *et al.*, 1990). A modificação de GlnA é catalisada pela proteína GlnE (ou ATase); em *E. coli*, a região C-terminal dessa proteína é responsável pela adenililação, e a porção N-terminal, pela remoção do AMP da proteína GlnA. A região N-terminal de GlnE interage com as proteínas PII, importantes transdutoras de sinal no metabolismo de nitrogênio (JAGGI *et al.*, 1997).

Uma segunda via de assimilação utiliza a enzima glutamato desidrogenase GDH, que catalisa a formação de glutamato a partir de 2-oxoglutarato e NH_4^+ em uma única etapa, como abaixo:



Em *E. coli*, a via GS-GOGAT é empregada em ambientes com muita energia disponível, ao passo que a via de GDH, menos eficiente, é utilizada em condições limitantes de energia (HELLING, 1998). O glutamato produzido serve como intermediário para as demais vias metabólicas de síntese de compostos nitrogenados (SIMS e FOLKES, 1964).

Além de ser produzido pelo metabolismo de compostos nitrogenados e/ou pela fixação biológica do nitrogênio, o amônio pode ser assimilado do ambiente. Isso pode ocorrer simplesmente por difusão através da membrana (MERRICK e EDWARDS, 1995); porém, transportadores de alta afinidade têm um papel fundamental quando a concentração desse íon é baixa, sendo encontrados em grande número de procariontes (NOINDORF, 2006).

1.2.2. Regulação global do metabolismo de nitrogênio pelo sistema Ntr

A regulação do metabolismo de nitrogênio em proteobactérias ocorre basicamente como uma resposta aos níveis intracelulares de amônio. Em *Escherichia coli*, um dos organismos mais bem estudados nesse aspecto, há o envolvimento de nove proteínas essenciais: GlnA, GlnB, GlnD, GlnK, AmtB, NtrB, NtrC, e RpoN (σ^{54}) (MERRICK e EDWARDS, 1995). O sistema funciona como uma cascata regulatória que depende da integração de sinais do ambiente celular pela proteína GlnB (HUERGO, 2006; LEIGH e DODSWORTH, 2007), que interage com outros componentes do sistema.

As proteínas GlnB e GlnK, também chamadas de proteínas PII, são proteínas triméricas sensoras de níveis intracelulares de carbono, relação ATP/ADP, e nitrogênio, que possuem um papel fundamental na resposta a níveis intracelulares de nitrogênio. GlnB está presente em bactérias e arqueias (leigh n dodsworth 2007), e é altamente conservada entre as diferentes espécies de bactérias (ARCONDÉGUY et al., 2001), o que é indicativo de sua importância fisiológica. Diversos organismos, entre eles *H. seropedicae*, produzem também uma proteína paráloga, GlnK, co-transcrita com o transportador de amônio AmtB (BENELLI et al., 1997). Em *E. coli*, GlnB é expressa constitutivamente, mas a expressão de GlnK e AmtB é regulada por amônio via NtrC (LEIGH e DODSWORTH, 2007).

GlnB e GlnK são capazes de ligar-se a ATP, ADP, e 2-oxoglutarato, e sofrem modificação por uridililação em um resíduo de tirosina-51 conservado (ARCONDÉGUY et al., 2001). A ligação desses dois efetores é pré-condição para que ocorra modificação pós-traducional dessas proteínas, mas geralmente as concentrações fisiológicas das duas moléculas não são limitantes para a ocorrência de uridililação de PII (LEIGH e DODSWORTH, 2007). Tanto a uridililação quanto a remoção do grupo uridilil de GlnB são catalisadas por uma mesma enzima, GlnD, que tem sua atividade regulada por glutamina. Quando a concentração de glutamina é baixa, a atividade de UTP-transferase é predominante, e GlnD tende a uridililar GlnB; em condições contrárias, observa-se o efeito inverso (ARCONDÉGUY et al., 2001). A figura 1 mostra um esquema desse processo:

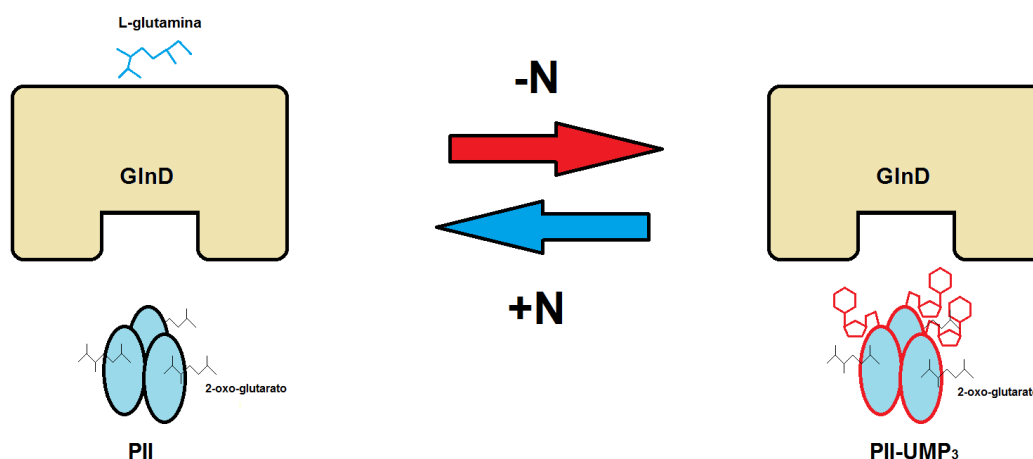


FIGURA 1 – Controle do estado de uridilação de PII por GlnD. Quando a concentração de nitrogênio é elevada, GlnD interage com L-glutamina, o que inibe sua atividade UTP-transferase e estimula sua atividade de remoção de UTP. Em baixas concentrações de L-glutamina, a atividade de UTP-transferase de GlnD é estimulada, e ela tende a uridililar GlnD. A uridilação só acontece quando PII está ligada a 2-oxo-glutarato e ATP (não mostrado). A uridilação ocorre independentemente em cada monômero de PII, e é não cooperativa em *E. coli* (ATKINSON et al., 1994). Em *H. seropedicae*, a uridilação de GlnB é mais eficiente que a de GlnK, mas a desuridilação é igualmente eficiente (BONATTO, 2007).

O sensoriamento dos níveis de glutamina feito pela proteína GlnD é uma medição direta da quantidade de nitrogênio disponível para as reações metabólicas, que é comunicada às proteínas PII via modificação pós-traducional.

Além da modificação pós-traducional, a ligação das proteínas PII às moléculas efetoras é um importante regulador de sua atividade. Em *E. coli*, a alta concentração de 2-oxoglutarato inibe a interação entre GlnB e seus alvos (LEIGH e DODSWORTH, 2007).

É importante notar que a interação de PII com seus efetores (ATP, ADP e 2-oxo-glutarato) e com glutamina (indiretamente, via GlnD) resulta na integração de sinal entre os níveis intracelulares de carbono (através da ligação a 2-oxo-glutarato), energia (ligação a ATP e/ou ADP), e nitrogênio (uridilação de PII em resposta a variações na concentração intracelular de glutamina)(OLIVEIRA, 2010); assim, o metabolismo do nitrogênio será influenciado pelo metabolismo geral da célula (COMMICHAU et al., 2006).

GlnB e GlnK são proteínas que apresentam forte similaridade e alguma sobreposição de função (ATKINSON e NINFA, 1998), mas algumas funções parecem ser restritas a apenas uma delas (LEIGH e DODSWORTH, 2007). Por exemplo, a proteína GlnK parece ter maior importância para a regulação da entrada de amônio na célula via AmtB. GlnK não uridililada interage com AmtB e impede a entrada de amônio por esse transportador (COUTTS et al., 2002); a resposta se manifesta poucos segundos após a ocorrência de um choque de amônio (JAVELLE et al., 2004). O gene *glnK* é sempre adjacente ao gene *amtB*, sugerindo a importância da interação entre eles, e servindo como critério de distinção entre os genes *glnB* e *glnK* (LEIGH e DODSWORTH, 2007). GlnB, expressa constitutivamente, teria um papel mais importante na regulação global do metabolismo de nitrogênio.

O estado de uridililação das proteínas PII controla a modificação da proteína GlnA (GS) pela proteína GlnE (ATase): em baixas concentrações de nitrogênio intracelular PII-UMP₃ interage com GlnE, estimulando a desadenililação de GS, o que a torna ativa; contrariamente, a interação de PII com GlnE estimula a adenililação de GS (ARCONDÉGUY et al., 2001). O controle fino desse sistema parece ser exercido pela formação de heterotrímeros de GlnB e GlnK; esse heterotrímeros são formados em condições limitantes de nitrogênio (quando há expressão de GlnK), e são menos eficientes na estimulação da atividade ATase de GlnE (HEESWIJK et al., 2000).

As proteínas NtrB e NtrC, por sua vez, agem como um sistema de dois componentes que interage com a proteína GlnB. NtrB é uma proteína que possui atividade de histidina-quinase e fosfatase; essa proteína interage com GlnB não-uridililada, e essa interação leva à inibição de sua atividade quinásica e aumento da atividade fosfatásica. Quando GlnB está uridililada (em condições limitantes de nitrogênio), a interação com NtrB é inibida, e esta recupera sua atividade de fosforilação (MERRICK e EDWARDS, 1995). A interação entre GlnB e NtrB também deixa de ocorrer quando a concentração intracelular de 2-oxo-glutarato é muito elevada, de modo que NtrB terá atividade quinase mesmo se a concentração de nitrogênio não for limitante (LEIGH e DODSWORTH, 2007).

NtrC é um ativador de transcrição dependente de σ^{54} que só é ativo quando fosforilado no resíduo Asp-54 (ARCONDÉGUY et al., 2001; SANDERS et al., 1992). A fosforilação de NtrC é feita por NtrB, sob baixas concentrações intracelulares de nitrogênio; isso leva à oligomerização de NtrC e aquisição de atividade de ativação transcricional (PORTER *et al.*, 1993).

Um resumo do mecanismo de regulação do metabolismo de nitrogênio de *E. coli* é representado na figura 2:

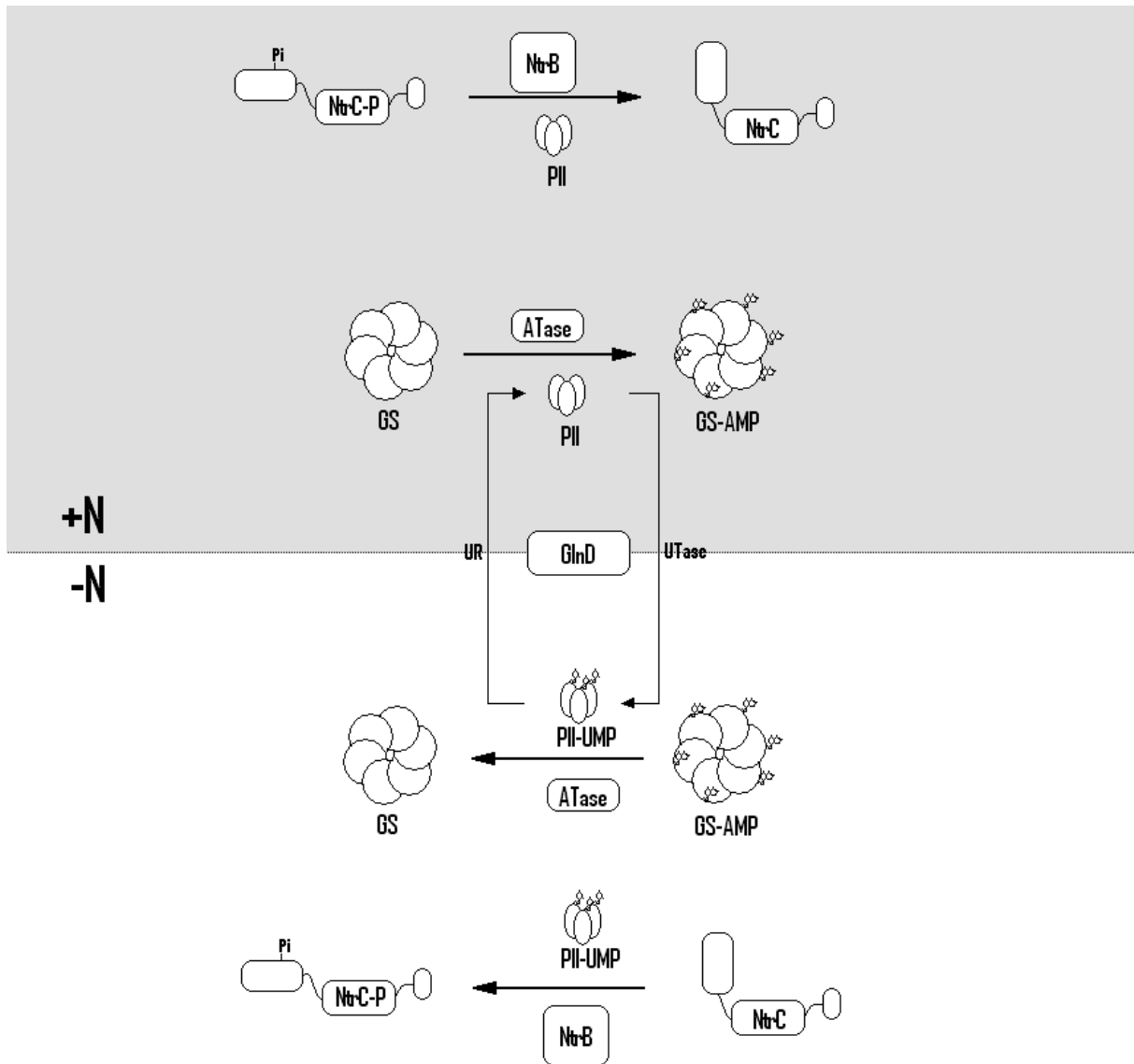


FIGURA 2 – Mecanismo geral de controle do metabolismo de nitrogênio em *E. coli*. GlnD (que se liga a glutamina) controla o estado de uridililação de PII, que controla a atividade de NtrB e GlnE. Durante a depleção de nitrogênio, GlnB (PII) uridililada interage com ATase (sinônimo para GlnE), que adenilila GlnA (GS), ativando a via de síntese de glutamina. GlnB-UMP também interage com NtrB, que fosforila NtrC, que se oligomeriza e se torna ativo. NtrC ativa a transcrição de diversos genes, entre eles o operon *glnKamtB*, que codifica uma segunda proteína PII e um transportador de amônio.

Quando fosforilado, NtrC ativa a transcrição σ^{54} -dependente dos genes *glnANtrBC* (a partir do promotor *glnA2*), *nasFEDCBA*, *glnHPQ*, *argT*, *hisKQMP* e *nifA*, em organismos que os possuem (KUSTU et al., 1989; MERRICK e EDWARDS, 1995). Esses genes são responsáveis pela assimilação de amônio, redução de nitrato e nitrito, transporte de glutamina, arginina, e histidina, e ativação transcricional dos genes *nif*, respectivamente. Outros operons ativados por NtrC, relacionados principalmente ao transporte de compostos nitrogenados, foram identificados em *E. coli*, em que aparentemente até 2% do genoma sofre algum tipo de controle por NtrC (ZIMMER et al., 2000). Em alguns organismos, a transcrição de *nifA* é independente de σ^{54} e de NtrC (ARCONDÉGUY et al., 2001).

1.3. *Herbaspirillum seropedicae*

H. seropedicae é um microrganismo diazotrófico Gram negativo pertencente à classe β das Proteobactérias (BALDANI et al., 1986). *H. seropedicae* é encontrado em associação com gramíneas de interesse econômico, como milho e cana-de-açúcar (SCHMID et al., 2006), e também foi isolado de plantas não gramíneas, com o abacaxizeiro (CRUZ et al., 2001).

O gênero *Herbaspirillum* (Burkholderiales; Oxalobacteriaceae) compreende 11 espécies (CARRO et al., 2011; JUNG et al., 2007; ROTHBALLER et al., 2006; SCHMID et al., 2006) correntemente identificadas, das quais 7 são encontradas na rizosfera ou em associação com monocotiledôneas. *Herbaspirillum seropedicae* é um microrganismo diazotrofo não-patogênico, encontrado na rizosfera e no interior de vasos xilemáticos (RONCATO-MACCARI et al., 2003). Suas células possuem de 0,6 a 0,7 micrômetros de comprimento, têm morfologia vibrióide, com 1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos. Isolado pela primeira vez a partir da rizosfera e das raízes de sorgo, milho e arroz (BALDANI et al., 1986), *H. seropedicae* também foi encontrado em cana-de-açúcar (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999), capim-elefante (OLIVARES et al., 1996), banana e abacaxi (CRUZ et al., 2001; WEBER et al., 1999).

H. seropedicae é considerado promotor de crescimento vegetal (PGPR). Diversos estudos demonstraram seu potencial como biofertilizante (BODDEY e DOBEREINER, 1995; GYANESHWAR et al., 2002; JAMES et al., 2002). *H. seropedicae* é capaz de fixar nitrogênio em condição de microaerobiose e baixa concentração de nitrogênio fixado (FU e BURRIS, 1989), e de produzir giberelina A3 e ácido indol-3-acético (BASTIAN et al., 1998). Essas duas características podem estar relacionadas ao aumento da biomassa de culturas inoculadas com *H. seropedicae*, conforme verificado em alguns cultivares de milho (DOTTO et al., 2010; RIGGS et al., 2001), arroz (BALDANI et al., 2000; GYANESHWAR et al., 2002), trigo (el-KOMY et al., 2003).

Os genes *nif* de *H. seropedicae*, que codificam proteínas relacionadas à fixação de nitrogênio, são transcritos in planta (RONCATO-MACCARI et al., 2003), e a bactéria é capaz de fixar nitrogênio no tecido vegetal enquanto houver abundância de carbono disponível (GYANESHWAR et al., 2002; JAMES et al., 2002). Outros estudos mostraram a presença de grande quantidade de nitrogênio proveniente da atmosfera em plantas inoculadas com *H. seropedicae*, se comparadas a controles não inoculados (BALDANI et al., 2000; el-KOMY et al., 2003; JAMES et al., 2002). Entretanto, o papel da produção de fitormônios não deve ser ignorado, uma vez que *H. seropedicae* promove o crescimento vegetal mesmo em cultivos fertilizados com nitrogênio, e foi verificada a produção de ácido indol-3-acético pela bactéria quando cultivada em excesso de amônio (SCHWAB, 2006).

A simbiose com *H. seropedicae* pode ser benéfica também para outros aspectos do desenvolvimento vegetal; (ARAÚJO et al., 2010) demonstraram que a inoculação com *H. seropedicae* tem efeito sobre a velocidade de germinação de arroz.

1.3.1. Regulação da FBN em *H. seropedicae*

O conjunto dos genes *nif* (responsáveis pela fixação de nitrogênio) de *H. seropedicae* inclui os genes *nifABHDKENXQWVUS*. Genes *mod*, *fdx*, *hsc*, e *fix* são encontrados dispersos entre eles. A região do genoma de *H. seropedicae* onde esses genes são encontrados contém um total de 46 orfs organizadas em ao menos sete operons (CHUBATSU et al., 2011; PEDROSA et al., 2001). A organização esquemática dessa região é mostrada abaixo:

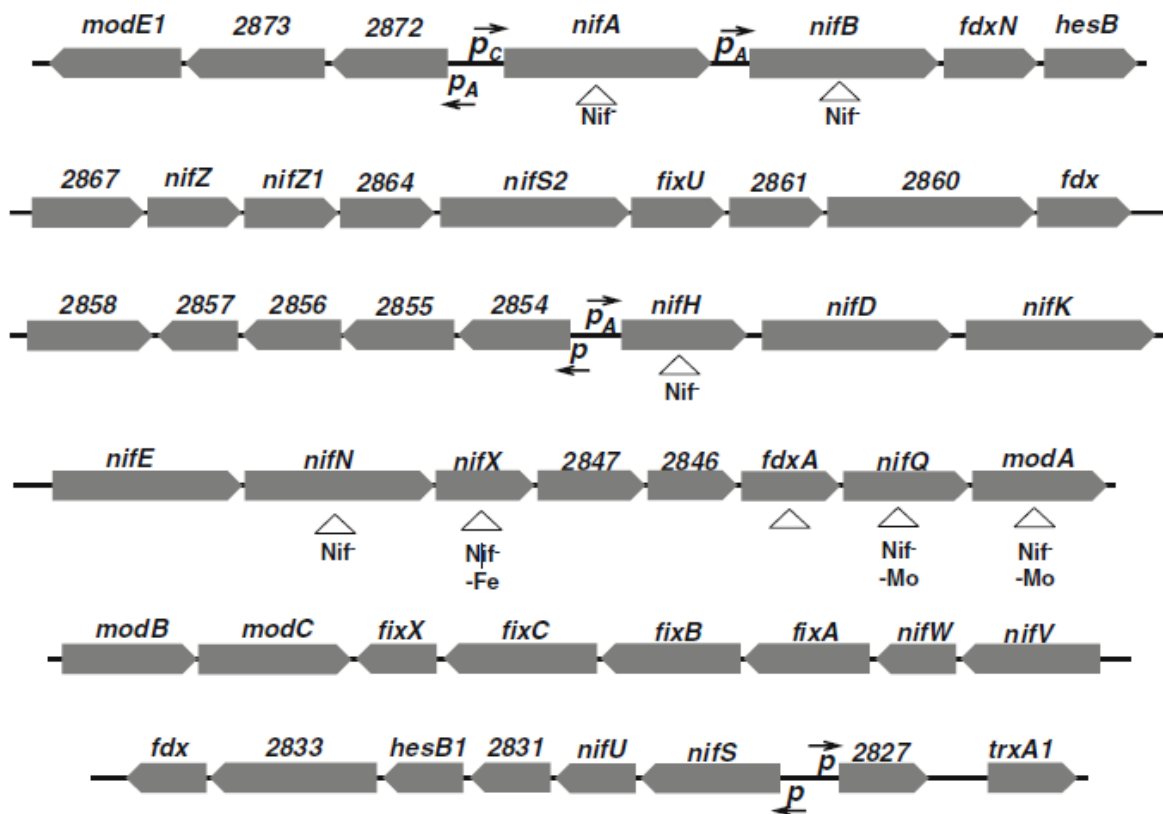


FIGURA 3 – organização dos principais genes *nif* de *H. seropedicae* (segundo CHUBATSU et al., 2011). Além dos genes cujos produtos são necessários para a maturação da nitrogenase, essa região contém outros genes ainda pouco caracterizados.

Os genes *nifHDKENXHsero_2847Hsero_2846fdxA* são transcritos em um RNA mensageiro policistrônico a partir do promotor *nifH*, e codificam as proteínas dinitrogenase redutase (Fe), as duas subunidades da dinitrogenase (FeMo), e três proteínas relacionadas à síntese e maturação do cofator de Ferro-Molibdênio da dinitrogenase, respectivamente. O promotor *nifH* foi caracterizado por Machado et al. (1996), e contém uma seqüência -24/-12 homóloga a de promotores dependentes de σ^{54} , dois sítios de ligação de NifA e um sítio para ligação de IHF.

Todo o controle da transcrição dos genes *nif* em *H. seropedicae* é dependente do ativador transcricional NifA, que reconhece a seqüência do promotor *nifH*. NifA é transcrito em um RNA mensageiro monocistrônico a partir de seu próprio promotor que apresenta dois sítios de ligação para NtrC (-384 e -349), três sítios de ligação para NifA (-312, -137, e -108), um sítio de ligação a IHF, e um promotor σ^{54} (-24/-12) (CHUBATSU et al., 2011). Estudos *in vitro*

demonstraram que a ativação da transcrição de *nifA* é estimulada por NtrC fosforilado (WASSEM, 2000). A presença dos sítios de ligação para NifA indica que NifA ativa pode ativar a transcrição a partir de seu próprio promotor, e NifA inativa pode reprimir sua produção, gerando um mecanismo de feedback negativo que possivelmente é importante na célula viva. IHF atua como ativador quando da ligação de NtrC ao promotor, e como inibidor quando NifA interage com o mesmo (WASSEM et al., 2000). Esse complexo mecanismo de regulação subordina a fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* ao controle da concentração intracelular de nitrogênio, uma vez que *nifA* será transcrita somente quando houver pouco nitrogênio disponível (condição para que NtrC esteja fosforilada); também permite que haja um *feedback* negativo de NifA sobre seu próprio promotor, impedindo que uma quantidade excessiva de NifA seja produzida, mesmo que a depleção de nitrogênio se prolongue (WASSEM et al., 2000).

Pelo conhecimento atual, pode-se sugerir que o passo mais importante para o controle da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* se refere à regulação transcricional dos genes *nif*, dependente de NifA e fator σ^{54} , e subordinado ao controle geral de nitrogênio intracelular. A regulação de atividade da nitrogenase em *H. seropedicae* não parece envolver modificação pós-traducional da proteína Fe, uma vez que não foram encontrados genes homólogos a DraT e DraG nesse organismo (CHUBATSU et al., 2011). No entanto, a atividade da nitrogenase de extratos de *H. seropedicae* decai rapidamente em resposta a choques de amônio (FU e BURRIS, 1989).

1.4. PROTEÍNA NifA

A proteína NifA é ativadora transcricional dos genes *nif* em presente nas proteobactérias diazotróficas (MERRICK e EDWARDS, 1995), pertencente à família de ativadores transcricionais dependentes de σ^{54} (SHINGLER, 1996), que inclui a proteína NtrC; em *Klebsiella pneumoniae*, as duas proteínas apresentam certo grau de homologia (DRUMMOND et al., 1986). Outras proteínas pertencentes à mesma família são as PspF, XylR, DctD e ZraR (OLIVEIRA, 2010).

Todas as proteínas dessa família possuem uma estrutura semelhante: elas apresentam um domínio N-terminal regulatório (a exceção sendo PspF – vide JOVANOVIC et al., 1996), um domínio central pertencente catalítico, e um domínio C-terminal de ligação a DNA. O domínio central dessas proteínas é bastante conservado e pertence à família AAA+ (ATPases associadas a diversas atividades celulares), uma família de proteínas presente em diversos polipeptídeos de procariotos e eucariotos (ogura n Wilkinson 2001; iyer n aravind 2004). O domínio AAA+ característico possui entre 200 e 250 aminoácidos, entre os quais estão presentes os motivos estruturais conservados Walker A (GXXXXGK[T/S]) e Walker B (hhhhDE, sendo h qualquer aminoácido hidrofóbico), responsáveis pela ligação e hidrólise do nucleotídeo trifosfato (Hanson n whiteheart 2005). Proteínas que contêm domínios da família

AAA+ estão envolvidos em atividades celulares tão diversas quanto replicação de DNA, ativação de transcrição, proteólise, fusão de vesículas, e transporte intracelular (ogura, Hanson).

Os ativadores de transcrição da família de NtrC possuem um motivo GAFTGA próprio não encontrado nas demais proteínas com domínio AAA+. Esses aminoácidos parecem estar envolvidos na interação com o fator σ^{54} (studholme n dixon 2003).

A ativação dessas proteínas parece estar relacionada com seu estado de oligomerização, que está relacionada à funcionalidade do domínio AAA+, cujos sítios de ligação a ATP são formados na interface entre os monômeros (Hanson n whiteheart 2005); tipicamente, elas são diméricas quando inativas e hexaméricas ou heptaméricas quando ativas (CHEN et al., 2008; ERZBERGER e BERGER, 2006).

Na maioria dos diazotrofos, a proteína NifA possui três domínios modulares (OLIVEIRA et al., 2009): um domínio N-terminal de função regulatória, um domínio central catalítico (ATPásico) e capaz de interação com σ^{54} , e um domínio C-terminal contendo um motivo hélice-volta-hélice (HTH) de ligação ao DNA. A exceção a essa regra é a proteína NifA de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*, que não possui o domínio N-terminal (IISMAA e WATSON, 1989). Os domínios central e C-terminal são relativamente conservados entre os organismos, mas o domínio N-terminal é bastante variável, refletindo a diversidade de mecanismos de regulação dessa proteína entre as diferentes espécies (FISCHER, 1994). Os domínios N-terminal e central são separados por um interdomínio rico em glutamina, o Q-linker (WOOTTON e DRUMMOND, 1989), que parece ser importante para a interação entre os domínios em outras proteínas da família de NtrC (PÉREZ-MARTÍN et al., 1995).

A proteína NifA de *H. seropedicae* segue esse modelo; nesse organismo, NifA possui 542 aminoácidos, e o gene *nifA* é transcrito de um operon monocistrônico a partir de seu próprio promotor (WASSEM, 2000). Uma representação esquemática é mostrada abaixo:



FIGURA 4 – Representação esquemática de NifA de *H. seropedicae*. As proteínas NifA de outros diazotrofos são semelhantes, mas podem não conter alguns dos motivos representados aqui. NifA contém um domínio N-terminal com um motivo GAF, regulatório. O domínio central, catalítico, possui os motivos Walker A, Walker B, e GAFTGA, comuns a todos os ativadores transcricionais da família AAA+. Entre esses dois domínios, está localizado o Q-linker, um interdomínio rico em resíduos de glutamina. O domínio Central conecta-se ao domínio C-terminal (que tem um motivo HTH de ligação ao DNA) através do interdomínio ID. No final do domínio central e início do linker ID, há um motivo conservado de quatro cisteínas, com provável envolvimento na inativação de NifA por O_2 .

Os domínios Central (AAA+) e C-terminal (HTH) de NifA são homólogos aos encontrados em outras proteínas, e sua função já foi discutida acima. O domínio N-terminal, por sua vez, apresenta um motivo GAF, encontrado bactérias e eucariotos (ARAVIND e

PONTING, 1997). O domínio GAF parece ser importante para a ligação a cGMP (HO et al., 2000; HURLEY, 2003), e sugere-se que sua função seja de transdução de sinal (ARAVIND e PONTING, 1997). O domínio N-terminal (GAF) e o domínio central (AAA+) de NifA de *H. seropedicae* são conectados por um interdomínio Q (Q-linker), uma seqüência de 18 aminoácidos rica em resíduos de glutamina.

A atividade de NifA é controlada pelos níveis intracelulares de amônio e oxigênio na maioria dos diazotrofos (DIXON e KAHN, 2004), mas o mecanismo de regulação é muito variado. Basicamente, as proteínas NifA de proteobactérias podem ser divididas em dois grupos: o primeiro compreende as γ -proteobactérias e *Azoarcus*, nas quais que a regulação de NifA se deve à interação com a proteína sensora NifL, formando ambas um sistema de dois componentes como em *Klebsiella pneumoniae* (BERGER et al., 1994); e as α e β -proteobactérias (exceto *Azoarcus*), em que não há presença de NifL, e a regulação de NifA ocorre de outra forma (OLIVEIRA, 2010).

Em diversos organismos, ocorre também regulação da transcrição do gene *nifA*. Em *H. seropedicae*, a transcrição de *nifA* é dependente de NtrC, estando diretamente subordinada ao controle geral do metabolismo de nitrogênio (WASSEM et al., 2000). Em *Azospirillum brasilense* e *Rhodospirillum rubrum*, por outro lado, a transcrição de *nifA* é constitutiva (ZOU et al., 2008).

Nas γ -proteobactérias, *nifA* é co-transcrito com o gene *nifL*, que codifica a proteína sensora NifL, que interage diretamente NifA de forma inibitória quando as condições celulares não são adequadas para a fixação de nitrogênio (MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004). A proteína NifL de diversos organismos é sensível a oxigênio, e interage com NifA quando seu cofator FAD está oxidado (MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004). NifL também é necessária para a inativação de NifA em resposta a alta concentração de nitrogênio intracelular; no entanto, o mecanismo de interação entre NifL e GlnK não parece ser conservado. Em *K. pneumoniae*, a interação entre essas duas proteínas leva à ativação de NifA, independentemente do estado de uridililação de GlnK (HE et al., 1998); NifA também parece interagir com GlnK em um sítio próximo ao de sua interação com NifL (GLÖER et al., 2008). Em *Azotobacter vinelandii*, por outro lado, a interação entre GlnK e NifL inativa NifA, e essa inibição é aliviada pela uridililação de GlnK, que impede sua interação com NifL (RUDNICK et al., 2002). Logo, embora GlnK claramente desempenhe um papel na regulação de NifA, o mecanismo observado em um organismo não pode ser extrapolado para os demais.

Nas α e β -proteobactérias, por outro lado, não há proteína NifL, e por isso NifA é regulada por outros mecanismos. Em diversos organismos, a inibição de NifA na presença de oxigênio é atribuída a um motivo de cisteínas presente no domínio Central e no interdomínio Q, que supostamente poderia coordenar íons de ferro (OLIVEIRA, 2010). Nesse caso, a mudança no estado de oxidação dos átomos de ferro seria responsável por mudanças na conformação de NifA que determinariam sua atividade ou inativação. Em *H. seropedicae*, foi mostrado que a

substituição de quaisquer desses resíduos de cisteína implica em completa perda de atividade da proteína NifA (OLIVEIRA et al., 2009).

A regulação de NifA em α e β -proteobactéria pela concentração intracelular de nitrogênio parece envolver alguma interação entre o domínio N-terminal de NifA e proteínas do tipo PII (leigh n dodsworth 2007)(ARSÈNE et al., 1996; NOINDORF et al., 2011; PASCHEN et al., 2001; ZOU et al., 2008).

Em *A. brasilense*, o domínio N-terminal de NifA é responsável pela regulação por amônio (ARSÈNE et al., 1996). A mutação de um único resíduo do domínio N-terminal (Tyr 18) leva à perda da interação com GlnB, mas não a perda de regulação por amônia (ARSÈNE et al., 1999). Nesse organismo, a interação direta entre o domínio N-terminal de NifA e GlnB foi detectada por experimentos de duplo híbrido (CHEN et al., 2003; CHEN et al., 2005).

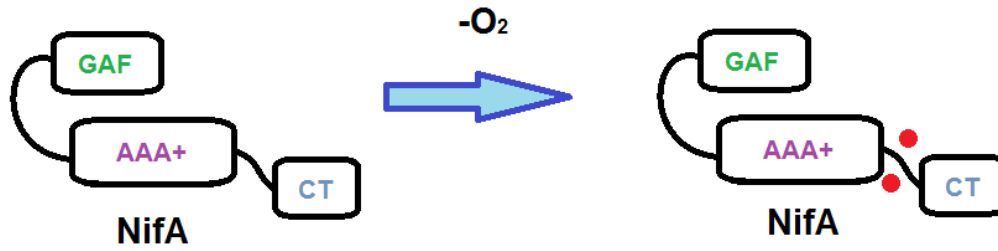
Em *Rhodobacter capsulatus*, que possui duas cópias funcionais do gene *nifA* (MASEPOHL et al., 1988), a atividade de NifA sofre influência de GlnB e GlnK (PAWLOWSKI et al., 2003); duplos mutantes *glnB/glnK* não tem regulação de NifA por amônio (DREPPER, 2003). Nesse organismo, NifA aparentemente é regulada por interação entre seus domínios N-terminal e C-terminal; mutações pontuais aleatórias introduzidas nesses domínios induzem a perda de regulação por amônio, sugerindo uma possível interação entre os dois domínios (PASCHEN et al., 2001).

Em *R. rubrum*, NifA parece ser ativada pela interação com GlnK-UMP. Mutações no aminoácido M173 e outros aminoácidos N-terminais geram variantes de NifA ativas mesmo na ausência de GlnB (ZOU et al., 2008). Como em *A. brasilense*, o domínio N-terminal de NifA interage diretamente com GlnB (ZHANG et al., 2004; ZOU et al., 2008).

Na proteína NifA de *H. seropedicae*, a regulação da atividade catalítica por amônio também é atribuída ao domínio N-terminal. A construção de um mutante N-truncado produziu uma variante de NifA ativa em *E. coli* e não regulada por amônio (MONTEIRO et al., 1999); posteriormente, foi demonstrado que essa variante N-truncada sofre regulação *in trans* pelo domínio N-terminal co-expresso a partir de outro plasmídeo em *E. coli*. ((MONTEIRO et al., 1999b), o que está de acordo com o modelo de regulação proposto para outras proteínas NifA e para outros ativadores de transcrição da mesma família (FIEDLER e WEISS, 1995; PÉREZ-MARTÍN et al., 1995; ZOU et al., 2008).

A perda da inibição de NifA de *H. seropedicae* em concentrações limitantes de nitrogênio é atribuída à interação entre o domínio GAF e a proteína GlnK em *H. seropedicae*, uma vez que o mutante *glnK* é incapaz de fixar nitrogênio (NOINDORF, 2006). O aumento da expressão de GlnB pode substituir parcialmente a ausência de GlnK nesse organismo (NOINDORF et al., 2011). A necessidade de interação com GlnK-UMP₃ pode estar relacionada com a falta de atividade da NifA selvagem de *H. seropedicae* em *E. coli*, assumindo-se que GlnK desta última não interage especificamente com NifA do primeiro. Um esquema do modelo de regulação atualmente aceito é mostrado na figura 5:

1 Regulação por O₂



2 Regulação por NH₄Cl

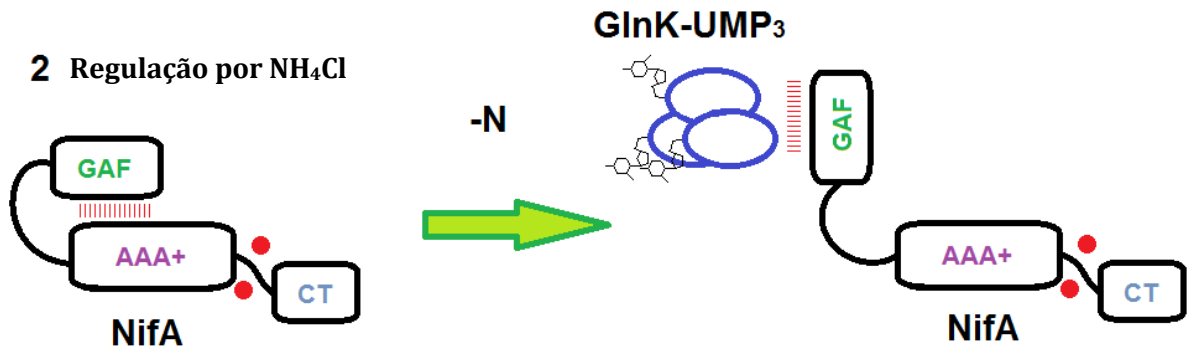


FIGURA 5 – Regulação de NifA de *H. seropedicae*. (1) Na ausência de oxigênio, forma-se um cluster de Fe-S essencial para a atividade de NifA. (2) Em baixa concentração de nitrogênio, GlnK-UMP₃ interage com o domínio N-terminal de NifA, impedindo a inibição deste sobre o domínio central.

2. JUSTIFICATIVA

O ativador transcricional NifA é o principal responsável pela regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*; e a fixação de nitrogênio responde por uma parcela importante do aumento de produtividade observado em culturas inoculadas com *H. seropedicae*. O estudo funcional da proteína NifA é, portanto, parte importante do entendimento da fixação de nitrogênio nesse organismo, que em última instância pode levar ao desenvolvimento de linhagens de bactéria mais eficientes na assimilação de nitrogênio atmosférico e disponibilização de amônio para os vegetais.

Além disso, o controle de proteínas NifA não-reguladas por NifL é relativamente pouco conhecido, apesar dos estudos conduzidos nas últimas décadas; regiões de interação do domínio GAF com proteína PII já foram identificadas em alguns organismos (CHEN et al., 2005; ZOU et al., 2008), mas ainda não em *H. seropedicae*. Além disso, detalhes da provável interação inibitória entre o domínio N-terminal e o domínio central ainda são desconhecidos. Assumindo-se que a interação entre GlnK e NifA e a interação interdomínios requerem regiões diferentes do domínio N-terminal para ocorrer, o estudo de variantes de NifA com domínios N-terminais truncados poderia auxiliar na identificação dessas regiões, com vistas a uma melhor caracterização da interação no futuro.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo construir variantes da proteína NifA com deleções progressivas do domínio N-terminal e do Q-linker, a fim de localizar possíveis regiões de interação desse domínio com a proteína GlnK e com o domínio central. Para tanto, propõe-se:

- 3.1. Construir e expressar variantes da proteína NifA de *H. seropedicae* truncadas nos aminoácidos 45, 90, 135, 165, 185, 203, 218, e 244.
- 3.2. Construir e expressar variantes da proteína NifA de *H. seropedicae* com deleções de 10, 14, 18 e 21 aminoácidos do Q-linker.
- 3.3. Testar a capacidade das variantes da proteína NifA de ativar uma fusão transcricional *nifH::lacZ* em *E. coli*.
- 3.4. Testar a capacidade das variantes da proteína NifA de ativar uma fusão transcricional *nifH::lacZ* em *H. seropedicae*.
- 3.5. Testar a capacidade das variantes da proteína NifA de complementar o fenótipo Fix⁻ dos mutantes *glnK* e *nifA*⁻ de *H. seropedicae*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

Produtos químicos foram adquiridos das companhias Sigma-Aldrich, Merck e JT Baker. Ágar, agarose, agarose LMP, IPTG, ONPG e Xgal foram adquiridos das empresas Invitrogen e Fermentas. As enzimas de restrição e seus respectivos tampões foram comprados da empresa Fermentas. Enzimas modificadoras foram obtidas da Invitrogen ou USB. Taq DNA polimerase foi adquirida da empresa Fermentas, ou purificada no próprio laboratório; o sistema FidelityTaq para amplificação livre de erros foi obtido da GEHealthcare. Gases para troca gasosa ou cromatografia foram comprados da empresa White-Martins. A água ultrapura foi produzida no laboratório com um equipamento Millipore, e autoclavada antes do uso.

4.2. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1.

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Bactéria	Genótipo/Fenótipo	Referência/Fonte
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	Sm ^R ; F' [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15]	SAMBROOK et al., 1989
S17.1	Sm ^R Tra ⁺	SIMON et al., 1983
JM109 (DE3)	F' <i>traD</i> 36 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> q Δ(<i>lacZ</i>)M15/ Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV</i> 44 e14– <i>gyrA</i> 96 <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi</i> <i>hsdR</i> 17	SAMBROOK et al., 1989
ET8000	<i>rbs lacZ</i> ::IS1 <i>gyrA</i> <i>hutC</i>	MacNEIL, 1981
BL21 (λDE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon</i> <i>hsdS</i> _B (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	SAMBROOK et al., 1989
<i>H. seropedicae</i>		
SmRI	Estirpe selvagem, Sm ^R , Nif ⁺	PEDROSA et al., 1997
LNglNkdel	SmR1 contendo deleção em fase de 192 nucleotídeos do gene <i>glnK</i> ; Sm ^R , Nif ⁻	NOINDORF, 2006
SmR54	Sm ^R , Km ^R , Nif ⁻ , <i>nifA</i> ::Km	PEDROSA et al., 1997
SmRI <i>nifH</i> :: <i>lacZ</i>	Sm ^R , Km ^R , <i>nifH</i> :: <i>lacZ</i>	Bruno Aquino, não publicado
SmRI <i>nifA</i> ⁻ <i>nifH</i> :: <i>lacZ</i>	Sm ^R , Km ^R , <i>nifH</i> :: <i>lacZ</i> , <i>nifA</i> ⁻	Bruno Aquino, não publicado
SmRI <i>glnK</i> <i>nifH</i> :: <i>lacZ</i>	Sm ^R , Km ^R , <i>nifH</i> :: <i>lacZ</i> , <i>glnK</i>	Bruno Aquino, não publicado

Plasmídeos	Genótipo/fenótipo	Referência/Fonte
SmR ^I <i>nifA</i> ⁻ <i>glnK</i> <i>Sm</i> ^R , <i>Km</i> ^R , <i>nifH::lacZ</i> , <i>nifA</i> ⁻ <i>glnK</i> <i>nifH::lacZ</i>		Bruno Aquino, não publicado
pT7-7	Ap ^R , vetor para expressão a partir do promotor T7	TABOR e RICHARDSON, 1985
pET28a	Km ^R , vetor para expressão a partir do promotor T7. Expressa a proteína com fusão His-tag N-terminal	Novagen
pTZ18R	Ap ^R , vetor para expressão a partir do promotor <i>lac</i>	Amersham-Pharmacia
pLAFR3.18	Cm ^R , Tc ^R , vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R	NOINDORF, 2006
pDK6pnifA	Km ^R , Contém a região promotora do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado Smal/SacI em vetor pDK6	NOINDORF, 2006
pRT22	Cm ^R , <i>nifH</i> (<i>K. pneumoniae</i>):: <i>lacZ</i> . Originado do plasmídeo pWVC22	TULI e MERRICK, 1988
pRAM1	Km ^R , contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado NdeI/BamHI em pET28a	MONTEIRO, 2001
pRAM1T7	Ap ^R , contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado NdeI/BamHI em pT7-7	Adriano A. Stefanello, não publicado
pRAM2	Km ^R , contém a variante N203 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	MONTEIRO, 2001
pRAM2T7	Ap ^R , contém a variante N203 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	MONTEIRO, 2001
pLAFRnifACT	Tc ^R , contém a variante N203 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	NOINDORF, 2006
pT7N45	Ap ^R , contém a variante N45 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	Este trabalho
pT7N90	Ap ^R , contém a variante N90 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	Este trabalho
pT7N135	Ap ^R , contém a variante N135 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	Este trabalho
pT7N165	Ap ^R , contém a variante N165 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	Este trabalho
pT7N185	Ap ^R , contém a variante N185 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	Este trabalho
pT7N218	Ap ^R , contém a variante N218 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	Este trabalho
pT7N244	Ap ^R , contém a variante N244 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	Este trabalho

	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	
pT7CC	Ap ^R , contém a variante CC de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	
pT7CC1	Ap ^R , contém a variante CC1 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	
pT7CC2	Ap ^R , contém a variante CC2 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	
pT7CC3	Ap ^R , contém a variante CC3 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pT7-7	
pETN45	Km ^R , contém a variante N45 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	
pETN90	Km ^R , contém a variante N90 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	
pETN135	Km ^R , contém a variante N135 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	
pETN165	Km ^R , contém a variante N165 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	
pETN185	Km ^R , contém a variante N185 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	
pETN218	Km ^R , contém a variante N218 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	
pETN244	Km ^R , contém a variante N244 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada NdeI/BamHI em pET28a	
pTZNifA	Ap ^R , contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
	clonado XbaI/HindIII em pTZ18R	
pTZN45	Ap ^R , contém a variante N45 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada XbaI/HindIII em pTZ18R	
pTZN90	Ap ^R , contém a variante N90 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada XbaI/HindIII em pTZ18R	
pTZN135	Ap ^R , contém a variante N135 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada XbaI/HindIII em pTZ18R	
pTZN165	Ap ^R , contém a variante N165 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada XbaI/HindIII em pTZ18R	
pTZN185	Ap ^R , contém a variante N185 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada XbaI/HindIII em pTZ18R	
pTZN203	Ap ^R , contém a variante N203 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada XbaI/HindIII em pTZ18R	
pTZN218	Ap ^R , contém a variante N218 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada XbaI/HindIII em pTZ18R	
pTZN244	Ap ^R , contém a variante N244 de <i>nifA</i> de <i>H.</i>	Este trabalho
	<i>seropedicae</i> clonada XbaI/HindIII em pTZ18R	

pRAMM1	Tc ^R , contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/HindIII em vetor pLAFR3.18	NOINDORF et al., 2011
pLAFRN45	Tc ^R , contém a variante N45 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/HindIII em vetor pLAFR3.18	Este trabalho
pLAFRN90	Tc ^R , contém a variante N90 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/HindIII em vetor pLAFR3.18	Este trabalho
pLAFRN135	Tc ^R , contém a variante N135 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/HindIII em vetor pLAFR3.18	Este trabalho
pLAFRN165	Tc ^R , contém a variante N165 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/HindIII em vetor pLAFR3.18	Este trabalho
pLAFRN185	Tc ^R , contém a variante N185 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/HindIII em vetor pLAFR3.18	Este trabalho
pLAFRN221	Tc ^R , contém a variante N221 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/HindIII em vetor pLAFR3.18	Este trabalho
pLAFRN244	Tc ^R , contém a variante N244 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado XbaI/HindIII em vetor pLAFR3.18	Este trabalho
ppnifANifA	Tc ^R , contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	Este trabalho
ppnifAN45	Tc ^R , contém a variante N45 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	Este trabalho
ppnifAN90	Tc ^R , contém a variante N90 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	Este trabalho
ppnifAN135	Tc ^R , contém a variante N135 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	Este trabalho
ppnifAN165	Tc ^R , contém a variante N165 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	Este trabalho
ppnifAN185	Tc ^R , contém a variante N185 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	Este trabalho

ppnifAN218	Tc ^R , contém a variante N218 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	Este trabalho
ppnifAN244	Tc ^R , contém a variante N244 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada SacI/HindIII em vetor pLAFR3.18 a montante do promotor <i>nifA</i>	Este trabalho

4.3. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

E. coli foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB – (SAMBROOK *et al.*, 1989)), e *H. seropedicae*, em meio Nfb-malato (PEDROSA e YATES, 1984). A composição desses meios é mostrada na tabela 2:

TABELA 2 – MEIOS DE CULTIVO PARA *E. coli* E *H. seropedicae*.

LB

Extrato de levedura	5 g/L
Triptona	10 g/L
NaCl	10 g/L

Nfb malato

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
CaCl ₂	0,02 g/L
NTA	56 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	20 mg/L
Biotina	0,1 mg/L
Ácido málico	5 g/L
K ₂ HPO ₄	0,89 g/L
KH ₂ PO ₄	7,975 g/L
Solução de microelementos*	10 mL/L

*Solução de microelementos para Nfb

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175 g/L
H ₃ BO ₃	1,4 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,12 g/L

Para a obtenção de meios sólidos, foram adicionados 15 g/L de ágar. O meio semi-sólido utilizado nos ensaios de nitrogenase foi obtido com a mistura de 89 partes de NFb-malato líquido com 11 partes de NFb-malato sólido.

O meio NFb-malato foi suplementado rotineiramente com 20 mM de NH_4Cl como fonte de nitrogênio, sendo então denominado meio NFbHPN-malato.

Para os ensaios de β -galactosidase em *E. coli*, foi empregado o meio mínimo NFDM (CANNON *et al.*, 1974) suplementado com 0,02% de casamino ácidos. A esse meio foram adicionados zero ou 20 mM de NH_4Cl , dependendo das condições do ensaio. A tabela 3 contém a composição do meio NFDM:

TABELA 3 – MEIO NFDM

K_2HPO_4	12,06g/L
KH_2PO_4	3,4g/L
MgSO_4	0,1 g/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025 g/L
D-glicose	20 g/L
Tiamina	5 $\mu\text{g/mL}$

4.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram pesados e dissolvidos para soluções-estoque no solvente mais apropriado. Antibióticos dissolvidos em água foram filtrados através de um filtro de 0,22 μm (Millipore). As soluções de antibiótico foram adicionadas aos meios de cultivo nas concentrações especificadas na tabela abaixo:

TABELA 4 - ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Solvente	Concentração (<i>E. coli</i>) - $\mu\text{g/mL}$	Concentração (<i>H. seropedicae</i>) - $\mu\text{g/mL}$
Estreptomicina	Água	20	80
Ampicilina	Água	250	-
Canamicina	Água	100	250
Cloranfenicol	Etanol	30	-
Tetraciclina	Etanol 70%	10	10
Ácido Nalidíxico	Água	5	5

4.5. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* ELETROCOMPETENTE

Um mililitro de cultura de *E. coli* em fase estacionária foi inoculado em 100 mL de meio LB, e incubado sob agitação a 37°C até DO_{600nm} entre 0.5 e 0.8 (medida no espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III®). A cultura foi então resfriada no gelo por 30 minutos, centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, e o precipitado foi lavado duas vezes com 50 mL de água MilliQ estéril e uma vez com 50 mL de glicerol 10%. Ao final da última lavagem, o precipitado foi ressuspensionado em ~400 µL de glicerol 10%, e foram confeccionadas alíquotas de 100 µL cada, que foram estocadas a -20°C.

A transformação foi feita mediante adição de 1 µL de ligação/plasmídeo íntegro a 100 µL de célula competente, transferência do mix para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad, cubeta de 0,2 cm), e aplicação de uma diferença de potencial de 1,8 – 2,5 kV com o aparelho Gene Pulser II ® (Bio-Rad). Após o choque, adicionou-se 0,9 mL de meio LB à cubeta, e incubou-se a suspensão a 37°C por 40 minutos. Após isso, as células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados.

4.6. PREPARO E TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* QUIMIOCOMPETENTE

O preparo de *E. coli* quimiocompetente seguiu o protocolo de (CHUNG *et al.*, 1989), com poucas modificações. Para cada transformação, 1 mL de cultura crescida até o início da fase exponencial (DO_{600nm} ~0,3) foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, e o pellet foi ressuspensionado gentilmente em 100 µL de solução TSS (LB + 10%PEG6000 + 50 mM $MgCl_2$ + 5% DMSO) estéril. Para a transformação, 10 µL de ligação ou 1 µL de plasmídeo íntegro foram adicionados a 100 µL de célula competente, e incubados por 15 minutos no gelo. Após esse tempo, foi dado um choque térmico (42°C por 45 segundos, seguido de 0°C por 2 minutos), seguido de ressuspensão das células em 500 µL de LB, incubação por ~40 minutos a 37°C, e plaqueamento em LA contendo os antibióticos apropriados.

4.7. TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO

Os plasmídeos a serem transferidos foram transformados e mantidos em *E. coli* S17.1. *E. coli* (doadora) e *H. seropedicae* (receptora) foram cultivados em meio LB e NFb-malato (respectivamente) até DO_{600nm} próxima a 0,5, quando então foram feitas misturas de *E. coli* e *H. seropedicae* nas proporções de 2µL:100µL e 15µL:50µL. As suspensões foram plaqueadas como gotas em placa de LA:NFb malato (8:22), sem antibióticos. Após 24 horas de crescimento, as placas foram raspadas, ressuspensionadas em 1 mL de NFb-malato, e

plaqueadas em NFb-malato sólido contendo ácido nalidíxico, estreptomicina e os demais antibióticos apropriados.

4.8. ANÁLISE *IN SILICO*

4.8.1. Edição e análise de seqüências

As seqüências de DNA (extensão .ab1) foram analisadas nos programas BioEdit (Ibis Biosciences) e MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011); os alinhamentos foram feitos preferencialmente neste último. A comparação das seqüências com bancos de dados *online* foi feita pelo portal do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), usando a ferramenta BLAST ((ALTSCHUL *et al.*, 1990)) e suas modificações.

O programa BioEdit também foi usado para a geração da maioria dos mapas plasmidiais apresentados nessa monografia.

4.8.2. Análise da seqüência do gene *nifA* de *H. seropedicae*

A seqüência do gene *nifA* de *H. seropedicae* foi obtida do genoma da estirpe SmRI (PEDROSA *et al.*, 2011), seqüenciado pelo consórcio GENOPAR. A seqüência de bases foi observada nos programas ARTEMIS (RUTHERFORD *et al.*, 2000) e BioEdit.

4.8.3. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

Os primers foram desenhados com o auxílio da ferramenta OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>), da companhia IDT, da qual foram comprados. Cada primer continha um sítio de restrição para NdeI, para facilitar a clonagem nos vetores de expressão, e para introduzir um códon de início de tradução em cada variante N-truncada amplificada. Os primers projetados estão listados abaixo, com o sítio de restrição sublinhado; a temperatura de fusão foi calculada com a ferramenta OligoAnalyzer (IDT).

TABELA 5 – PRIMERS DESENHADOS E SINTETIZADOS PARA USO NESSE TRABALHO

primer	seqüência	Tm (50 mM Na ⁺)
n45	CTCTCCGCCCATATGGAAGG	57,5°C
n90	ACCGGCAAGCATATGCAGACG	60,4°C
n135	GCTGCCCGTCATATGCTGGGT	62,4°C
n165	ATGGTGGCCCATATGATCGAA	56,3°C
n185	CAGCAGCTGCATATGGAAAAG	54,5°C
CC	GTAATCGGCATTTCCAAGGCG	56,9°C
CC1	AAGCTCGATAACGTAATC	46,4°C
CC2	CAGGGCAAGTACAAGCTC	53,3°C

CC3	TCCCGGCAACTCCAGGGC	63,4°C
CC4 (n218)	CACCAGTCCCATATGTCGCGCTCG	63,3°C
CC5 (n244)	ATCCATTACCATATGGCCACT	53,6°C
N	TTGCAGCTGCTGGCGCTCGGC	68,3°C

Outros primers utilizados foram elaborados em trabalhos anteriores; estão relacionados abaixo, com os sítios de restrição sublinhados:

TABELA 6 – PRIMERS DESENHADOS EM TRABALHOS ANTERIORES

primer	seqüência	Tm	referência
HsNifA1	TAGGGATCCCATATGGCCACT	57,4°C	MONTEIRO, 2001
HsNifA2A	AGAGGATCCTCAGAACTTC	50,5°C	MONTEIRO, 2001
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG	47,5°C	NEB
T7 terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAG	46,3°C	NEB
Universal	GACGTTGAAAACGACGGCCAGT	59,9°C	SAMBROOK et al., 1989
Reverso	TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC	55,4°C	SAMBROOK et al., 1989
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	67,9°	YOUNG et al., 1991
Y3	TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTC	59,9°C	CRUZ, et al., 2001

Uma representação esquemática do anelamento dos primers no gene *nifA* é mostrada na figura 6:

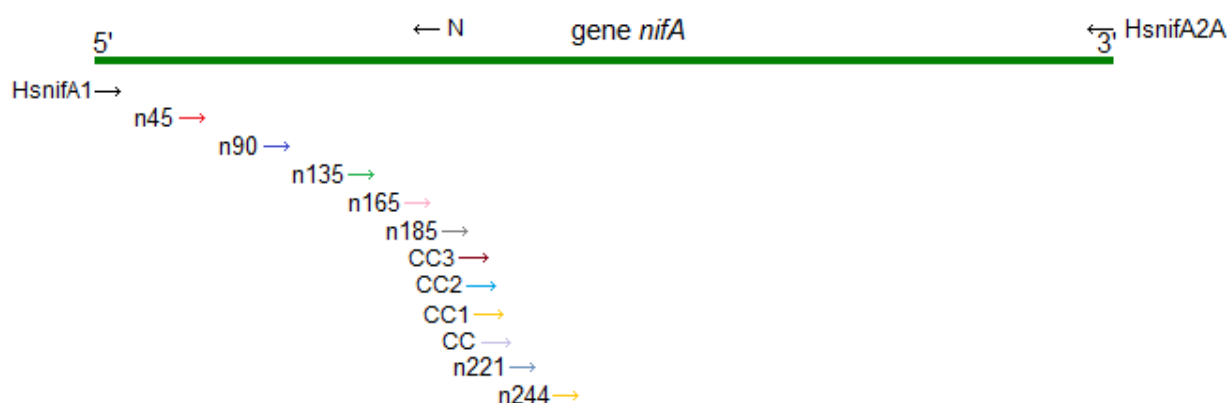


Figura 6 – representação esquemática do gene *nifA* mostrando o anelamento dos primers 5' (na parte inferior da figura) e dos primers 3' (na porção superior).

4.9. AMPLIFICAÇÃO DO DNA

4.9.1. Amplificação dos fragmentos codificantes para as proteínas N45, N90, N135, N165, N185, N203, N218, e N244

O plasmídeo pRAM1 foi usado como DNA molde para a amplificação dos fragmentos usando o primer HsNifA2A e os primers n45, n90, n135, n165, n185, CC4 e CC5. Os fragmentos foram amplificados em sistemas de 50 µL usando Fidelity Taq MasterMix® (GE

Healthcare), ou Phusion polymerase (Finnzymes), para minimizar a ocorrência de mutações. A reação foi incubada em um termociclador Eppendorf *Mastercycler gradient*.

4.9.2. Amplificação dos fragmentos codificantes para as proteínas CC, CC1, CC2, e CC3.

O plasmídeo pRAM1 foi usado como DNA molde para a amplificação de fragmentos usando os conjuntos de primers [HsnifA1 – N] e [(CC, CC1, CC2, e CC3) – HsnifA2A]. Os fragmentos foram amplificados em sistemas de 10 µL usando Phusion Polimerase (Finnzymes), em tampão com cloreto de potássio. A reação foi incubada em um termociclador Eppendorf *Mastercycler gradient*, e posteriormente foram ligados entre si para gerar os fragmentos que codificam CC, CC1, CC2, e C3.

4.9.3. Amplificação do gene 16S a partir de cultura de *H. seropedicae*.

Cem microlitros de cultura de *H. seropedicae* foram aquecidos a 95°C por 15 minutos, para acarretar o rompimento das células. Os extratos foram centrifugados a 13400 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 0,5 µL do sobrenadante foi coletada e utilizada como DNA molde para a amplificação em sistema de 10 µL. Foram feitas amplificações usando os primers Y1 e Y3 (16S). O sistema de amplificação e o programa usado são mostrados abaixo:

TABELA 7 – SISTEMA DE REAÇÃO E PROGRAMA PARA AMPLIFICAÇÃO DE 16S.

Sistema de Reação		Programa	
Tampão Taq (KCl) 10x (Fermentas)	1 µL	Lid=102°C	
MgCl 50 mM	0,8 µL	No Wait = Auto	
dNTPs 5 mM	0,4 µL	1	94°C 5'
Primer 1	0,2 µL	2	94°C 30''
Primer 2	0,2 µL	3	62°C 30''
Extrato de <i>H. seropedicae</i>	0,8 µL	4	72°C 1'30''
Taq DNA Polimerase	0,08 µL	5	Go to 2 rep 30
Água ultrapura	16,3 µL	6	72°C 5'
Total	6,52 µL	7	Hold 4°C

4.10. SEQÜENCIAMENTO DO DNA

O seqüenciamento dos plasmídeos foi feito pelo método de Sanger et al. (1977), usando dideoxiribonucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluorescência. Os produtos de cada reação foram analisados por um seqüenciador ABI377 ou ABI3500 (Applied Biosystems).

As reações foram feitas utilizando os kits DYEnamic ET Dye Terminator Mix (GE Healthcare) ou BigDye Terminator (Applied Biosystems), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para seqüenciamentos feitos a partir do vetor pT7-7, foram usados os primers T7forward e T7terminator (descritos na seção 4.8.3).

4.11. MANIPULAÇÃO DO DNA

4.11.1. Digestão com endonucleases de restrição

As digestões de DNA para clonagem gênica foram feitas em sistemas de 40 µL contendo 5 unidades de enzima, durante 4h ou 12h a 37°C. Após a incubação, os sistemas foram aquecidos por 20 minutos para inativar as enzimas termossensíveis. Quando se trabalhou com enzimas resistentes ao calor, foi feita extração com clorofórmio e precipitação. O tampão usado em cada digestão foi escolhido conforme a recomendação do fabricante (Fermentas).

4.11.2. Ligaçao

As reações de ligação foram feitas em sistemas de 10 ou 15 µL, nos quais inserto e vetor foram adicionados com razão molar de 3:1 entre as pontas de cada fragmento, respectivamente. Os sistemas foram preparados de acordo com a recomendação do fabricante (Fermentas), incubados a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos, e então transformados em *E. coli*.

4.11.3. Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), sem modificações significativas.

4.11.4. Análise eletroforética dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose, nas concentrações 1% (fragmentos >500 bp) ou 2% (fragmentos <500 bp) em tampão TBE (Tris 10,8 g/L; ácido bórico 5,5 g/L; EDTA 4 mM). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a 60-80 V por 40-60 minutos; após isso, o gel foi incubado com brometo de etídeo 0,002%, e visualizado sob luz UVC (254 nm).

4.11.5. Purificação de fragmentos de DNA extraídos de gel de agarose

Para a extração dos fragmentos, as amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose *low melting point* 0,8% e submetidas a 60 V por 1-2 h. O gel foi incubado com brometo

de etídeo e visualizado sob luz UVB (302 nm) em um transluminador 3UV™ Transilluminator (UVP Corp.). As bandas de interesse foram recortadas do gel, e o DNA foi extraído da agarose usando o kit Illustra Gfx (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

4.11.6. Preparação dos vetores para ligação

Os vetores foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas em sistemas de 40 µL, e então incubados com 1U de Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) por 1 h a 37°C. As enzimas foram inativadas mediante incubação a 80°C por 15 min. Os vetores cortados e desfosfatizados foram purificados com o kit Illustra Gfx (GE Healthcare), e a concentração e pureza do DNA foi estimada por espectrofotometria (vide 4.9.7).

4.11.7. Quantificação de DNA por espectrofotometria

A concentração do DNA foi estimada pela absorbância da amostra em 260 nm, medida em um aparelho Nanodrop 2000 (Thermo-Fischer Scientific). A pureza da amostra foi inferida pela relação absorbância 260nm/absorbância 280nm, sendo consideradas puras as amostras em que essa relação se aproximava de 2.

4.12. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE EM *E. coli*

Células de *E. coli* abrigando o plasmídeo pRT22 e os plasmídeos codificantes para as variantes de NifA foram cultivadas em meio LB contendo os antibióticos apropriados a 37°C por 12h. Após esse período, 100 µL de cada cultura foram repicados para 3 mL de meio NFDM suplementado com 20mM NH₄Cl e 3% de LB, mais os antibióticos. Os inóculos foram incubados a 37°C por 12h. A partir desses inóculos, foram feitos os inóculos definitivos em NFDM suplementado com 0,02% de casaminoácidos e 0,5 mM de IPTG, com a adição de zero ou 20 mM NH₄Cl, com DO_{600nm} inicial de 0,2. Quando necessário, os frascos foram selados com rolhas de borracha, e submetidos a troca de ar por gás nitrogênio por 30 minutos. As células foram incubadas por 8 h a 30°C e 120 rpm, e 100 µL de cada cultura foram usados para o ensaio de atividade da β-galactosidase, conforme descrito por Miller (1972). A degradação do ONPG, a presença de restos celulares e a densidade óptica das culturas foram quantificadas por espectrofotometria (415 nm, 550 nm, e 595 nm, respectivamente) em um leitor de microplaca EL_x800 (BioTek), e a atividade de β-galactosidase foi calculada segundo a equação:

$$\frac{1000(DO_{415} - 1,75(DO_{550}))}{(\text{volume})(DO_{595})(\text{tempo de reação})}$$

4.13. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE EM *H. seropedicae*

A atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae* também foi feita segundo o protocolo de Miller (1972), mas as condições de cultivo foram diferentes das empregadas para *E. coli*. Células de *H. seropedicae* contendo os plasmídeos codificantes para as variantes de NifA foram inoculadas em meio NFbHPN-malato contendo os antibióticos apropriados, e incubadas por 24 horas a 30°C e 120 rpm. A partir dessas culturas, foram feitos inóculos 1:500 em 20 mL de meio NFb suplementado com 4 mM de NH₄Cl, e as culturas foram incubadas por 24 horas a 30°C e 120 rpm, em erlenmeyers de 250 mL. O inóculo definitivo foi feito em meio NFb suplementado com 4 mM de NH₄Cl, nas condições descritas a seguir:

4.13.1. Atividade de β -galactosidase em diferentes concentrações de oxigênio

Os inóculos definitivos foram feitos em 2 mL de meio de cultivo em frascos de 22 mL, para uma DO_{600nm} inicial de 0,1. Os frascos foram selados com rolhas de borracha, e procedeu-se com a troca do ar dos frascos por gás nitrogênio por 45 minutos. Para a obtenção de diferentes concentrações de oxigênio, adicionou-se 1,5 mL de ar atmosférico a cada frasco. A concentração de oxigênio foi estimada por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo 450 GC (Varian) equipado com um detector de condutividade térmica (TCD), utilizando como padrão amostras de ar atmosférico. As culturas foram incubadas a 30°C e 120 rpm por 5 horas, e então foi feita a determinação da atividade de β -galactosidase, densidade óptica da cultura, e concentração de proteínas da cultura.

4.14. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA NITROGENASE EM *H. seropedicae*

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno a etileno, conforme descrito por Klassen et al. (1997).

Vinte microlitros de cultura de *H. seropedicae* em fase estacionária foram inoculados em 4 mL de meio NFb-malato semi-sólido suplementado com 0,5 mM de glutamato. As culturas cresceram formando uma película por 24 horas a 30°C, e os frascos foram vedados e 600 μ L de acetileno foram adicionados a suas atmosferas. Finda 1 hora de incubação, 500 μ L de amostra da atmosfera dos frascos foram colhidos e injetados em aparelho de cromatografia gasosa Varian Star 3400 CX (Varian) equipado com uma coluna Porapak e detector de ionização de chama (FID). O etileno padrão foi fornecido pela empresa White-Martins. A dosagem de proteína das culturas foi feita pelo método de Bradford, conforme descrito na seção 4.15.

4.15. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A dosagem da concentração de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), adaptado para leitura em leitor de microplaca. A proteína BSA foi utilizada para fazer a curva-

padrão de concentração de proteína. A leitura de DO_{595nm} foi feita em placa de 96 poços no equipamento ELx800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek instruments Inc.), sendo que cada poço continha 30 μ L de amostra e 170 μ L do reativo de Bradford.

Para dosagem de proteínas de culturas em meio líquido ou semi-sólido, as culturas de bactéria foram homogeneizadas, lisadas durante 30 minutos com NaOH 50 mM, e centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se 30 μ L dos sobrenadantes para uma microplaca de 96 poços, adicionou-se 170 μ L de reativo de Bradford, e procedeu-se com a leitura.

4.16. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)

A eletroforese desnaturante de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida 12%, conforme descrito por Laemmli, (1970). As amostras contendo proteína foram diluídas em tampão de amostra desnaturante, e aquecidas a 90°C por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel. As amostras foram submetidas a 180 V por 40 minutos, e coradas com solução corante de azul de Coomassie (Brilliant Blue R). O excesso de corante foi removido com solução descorante.

A composição dos géis está descrita abaixo:

TABELA 8 – GEL DE POLIACRILAMIDA 12% DESNATURANTE

Gel pra SDS-PAGE (receita para dois géis)

Gel separador (12%)		Gel de empilhamento (4%)	
H ₂ O	4,35 mL	H ₂ O	3,162 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,3 mL
SDS 10%	100 μ L	SDS 10%	50 μ L
Acrilamida 40%	3 mL	Acrilamida 40%	487,5 μ L
APS 10%	100 μ L	APS 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L	TEMED	10 μ L

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AMPLIFICAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE *nifA*

Os fragmentos de DNA codificantes para as variantes N45, N90, N135, N165, N185, N218 e N244 foram amplificados a partir do plasmídeo pRAM1 com FideLiTaq, em sistemas finais de 50 μ L. Todos os sistemas continham o primer HsNifA2A, que é complementar à porção 3' do gene *nifA*. Representações esquemáticas dos fragmentos obtidos são mostradas na figura 7:



Figura 7 – Representação esquemática das amplificações de variantes do gene *nifA*. O gene completo está representado pela barra verde espessa. Todos os fragmentos amplificados possuem a mesma porção 3', amplificada com o primer HsNifA2A; as porções 5' foram amplificadas com os primers n45, n90, n135, n165, n185, n221, e n244.

Os sistemas de reação e o programa utilizado estão descritos na tabela 10:

TABELA 9 – SISTEMA DE REAÇÃO E PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAM VARIANTES DE *NifA*.

Sistema		Programa	
FideliTaq MasterMix	25 μ L	Lid=102°C	
Primer 5' 10 pM	0,5 μ L	No wait=auto	
Primer 3' (HsNifA2A) 10 pM	0,5 μ L	94°C	2'
DNA molde (pRAM1)	1 μ L	94°C	30''
Água ultrapura	23 μ L	50°C	30''
		68°C	1'30''
		Go to 2 rep 25	
		68°C	5'
		Hold 10°C	

O resultado das amplificações é mostrado na figura 8:

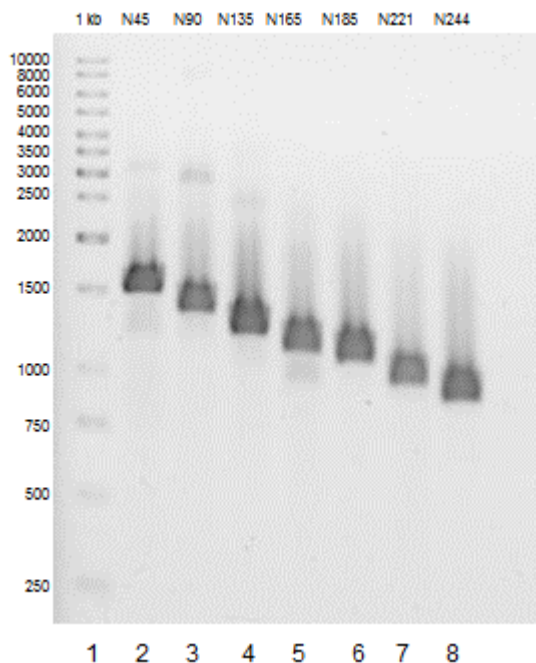


Figura 8 – ampliações de variantes 5'-truncadas do gene *nifA* a partir do plasmídeo pRAM1. (1) marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas) (2) a (8) ampliações usando os primers n45, n90, n135, n165, n185, n221 e n244 como primers 5', e o primer HsNifA2A como primer 3'.

A produção dos fragmentos de DNA que codificam as variantes CC, CC1, CC2, e CC3 foi feita em duas etapas: primeiramente, a porção 5' do gene *nifA* (comum às quatro variantes) foi amplificada com os primers HsNifA1 e N, utilizando a enzima Phusion Polymerase. Paralelamente, a porção 3' de *nifA* foi amplificada usando o primer HsNifA2A em conjunto com um dos seguintes oligodeoxinucleotídeos: CC, CC1, CC2 ou CC3. Uma representação esquemática dos fragmentos obtidos é mostrada na figura 9:

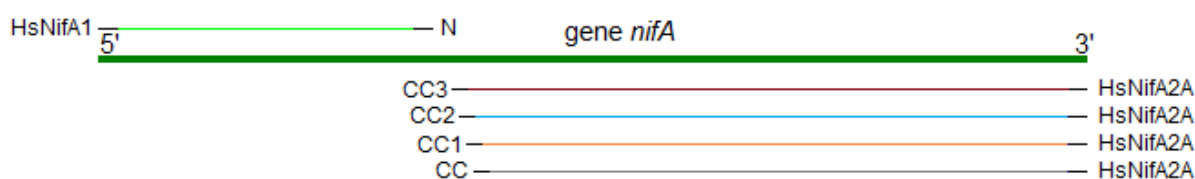


Figura 9 – Representação esquemática da amplificação de fragmentos do gene *nifA*. A região codificante para o domínio N-terminal (aminoácidos 1 – 185) foi amplificada com os primers HsNifA1 e N. O domínio Central+C-terminal foi amplificado com quatro conjuntos de primers, nos quais o primer 3' era sempre HsNifA2A.

Os sistemas de reação foram tais como descritos na tabela 10; o resultado das ampliações é mostrado na figura 10:

TABELA 10 – SISTEMA DE REAÇÃO E PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAM O DOMÍNIO N-TERMINAL E AS VARIANTES DOS DOMÍNIOS CENTRAL+C-TERMINAL.

Sistema	Programa	
Tampão HF	Lid=102°C	
Primer 5'	No wait=auto	
Primer 3'	98°C	1'
DNA molde (pRAM1)	98°C	10''
DMSO	60°C	15''
Phusion	72°C	15''
Polimerase	Go to 2 rep 25	
Água ultrapura	72°C	2'
	Hold 4°C	

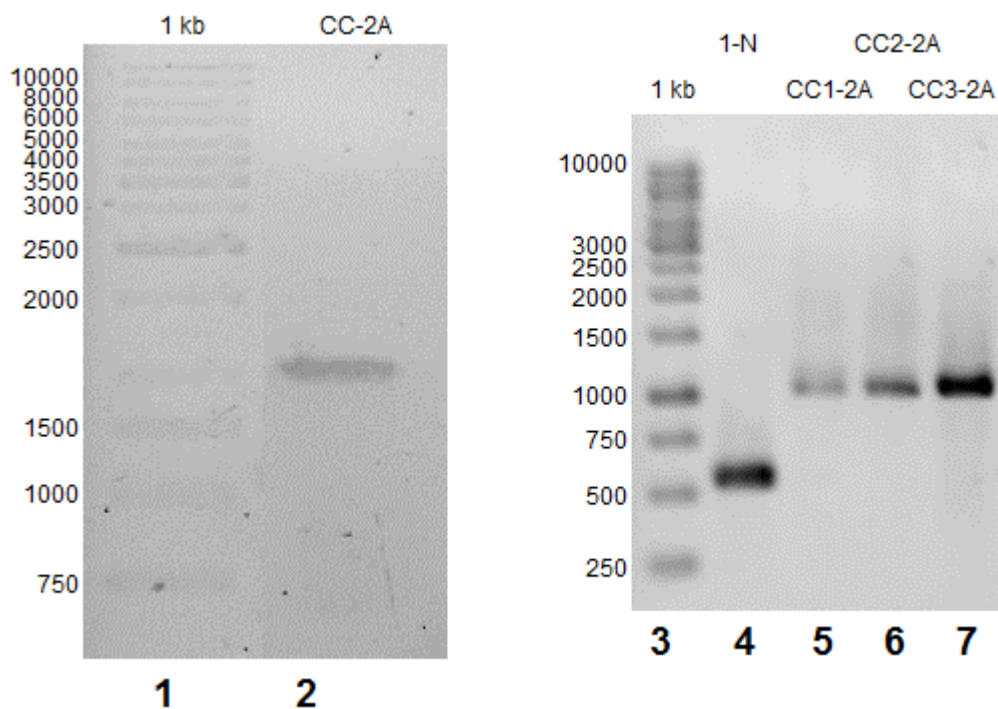


Figura 10 – ampliações de fragmentos do gene *nifA* a partir do plasmídeo pRAM1. (1) e (3), marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas); (2), (4) a (8) ampliações usando os primers CC e HsnifA2, HsnifA1 e N, CC1 e HsnifA2A, CC2 e HsnifA2A, e CC3 e HsnifA2A, respectivamente.

Em seqüência, o fragmento 1-N foi ligado a cada um dos demais fragmentos (CC-2A, CC1-2A, CC2-2A, CC3-2A) usando T4 DNA ligase. O produto de ligação foi usado como molde para uma nova reação de amplificação de DNA usando os primers HsNifA1 e HsNifA2A; essa segunda amplificação foi feita com Taq DNA polimerase (Fermentas). A figura 11 corresponde a um gel de agarose 1% dos fragmentos.

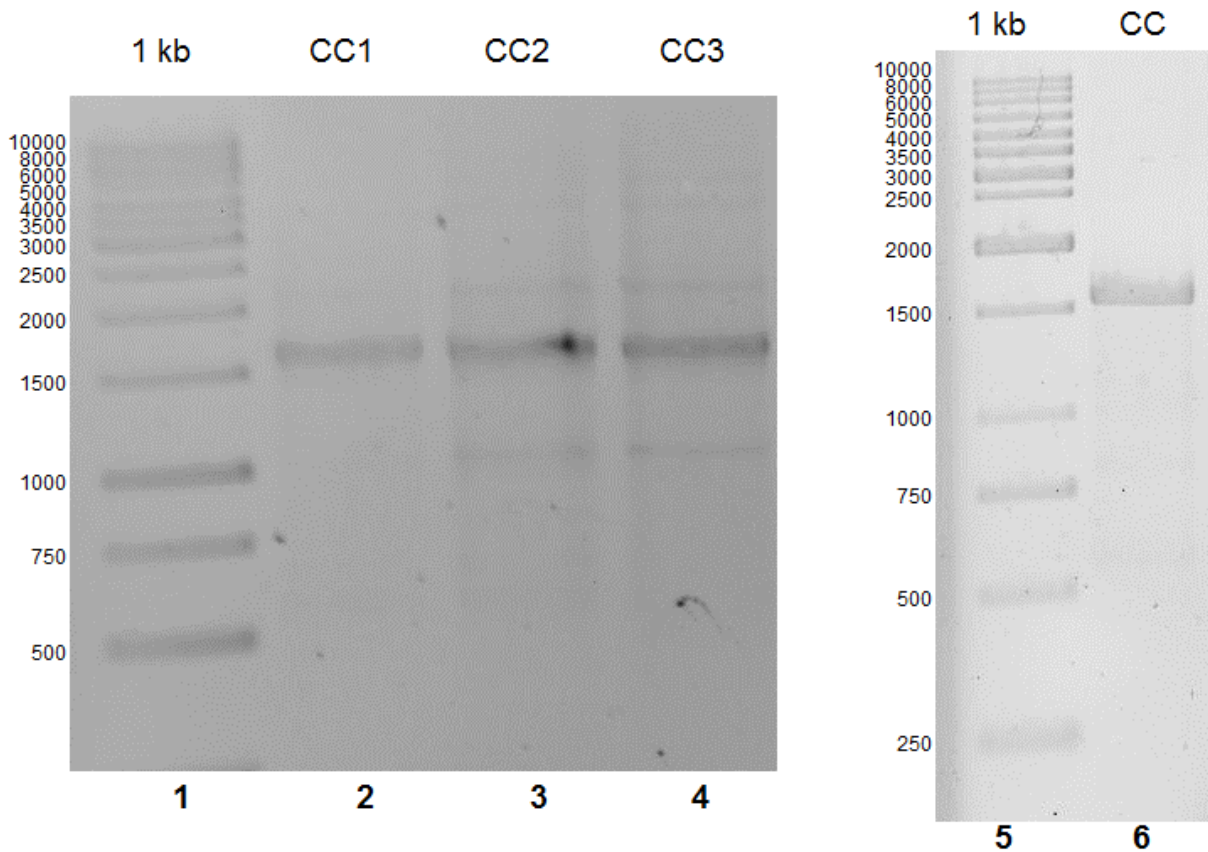


Figura 11 – ampliações de variantes do gene *nifA* a partir das ligações de HsnifA1-N a (CC, CC1, CC2, e CC3)-HsnifA2A. (1) e (5), marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas); (2) a (4) e (6), ampliações dos sistemas de ligação usando os primers HsnifA1 e HsNifA2A.

Ao final, foram obtidos fragmentos que codificam para 11 novas variantes do gene *nifA*; essas novas construções, mais a proteína NifA inteira e a variante N-truncada (N203) (MONTEIRO, 2001), são mostradas no na figura 12.

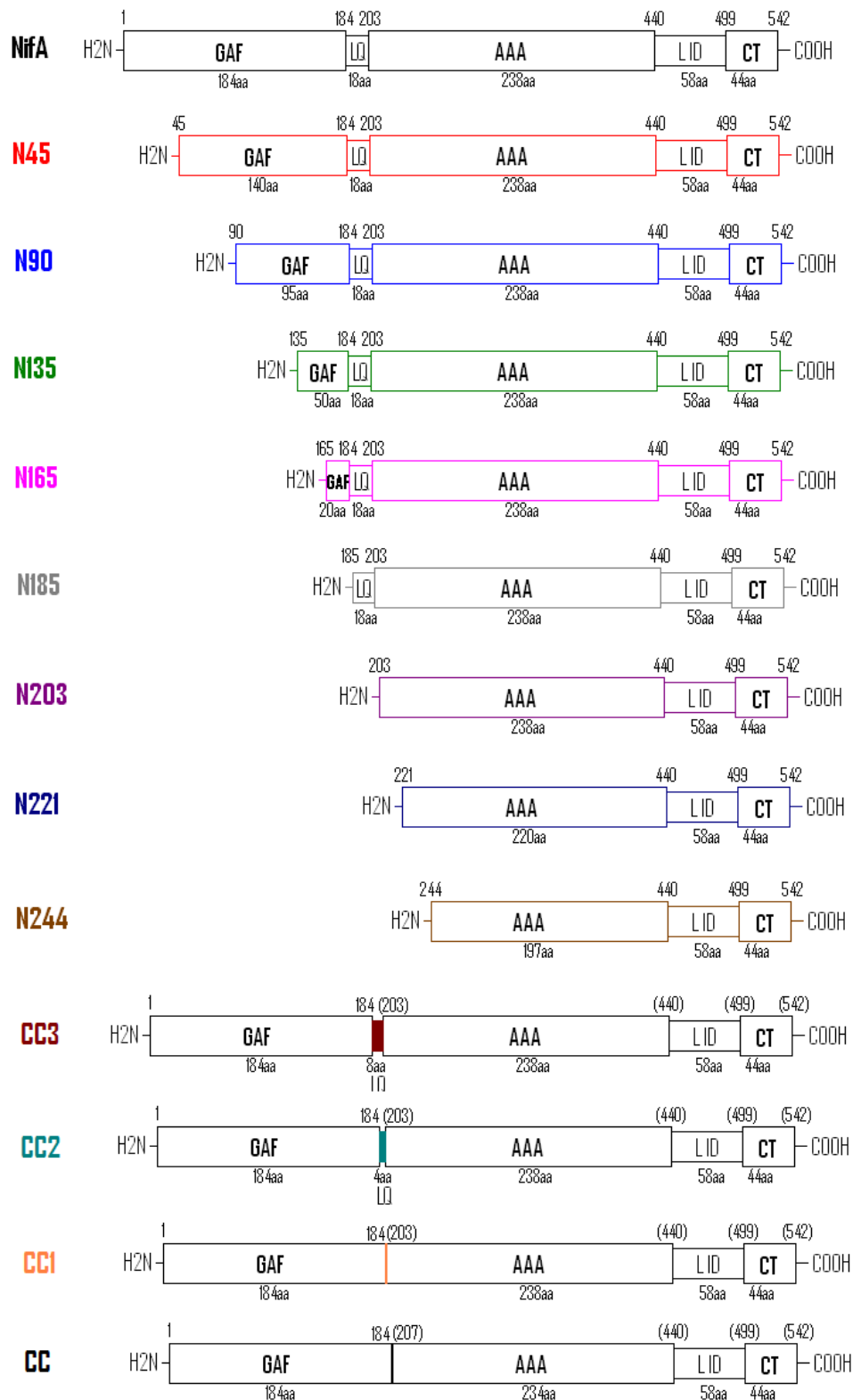


Figura 12 – esquematização das variantes de NifA analisadas nesse trabalho, enfatizando os domínios modulares. As variantes N45, N90, N135, e N165 possuem domínios N-terminais N-truncados; a variante N185 não possui domínio N-terminal; e a variante N203 (MONTEIRO, 2001) não possui o domínio N-terminal nem o Q-linker. N221 e N244 possuem deleções que retiram aminoácidos N-terminais até o domínio Central. As variantes CC, CC1, CC2, e CC3 possuem deleções progressivas de aminoácidos N-terminais do Q-linker.

5.2. CLONAGEM DAS VARIANTES DE *nifA* EM VETORES DE EXPRESSÃO

Os fragmentos amplificados foram clonados inicialmente no vetor de expressão pT7-7, e seqüenciados com os primers T7 forward e T7 terminator para assegurar a ocorrência das mutações desejadas e a não-ocorrência de mutações pontuais adicionais. A partir desses clones, os fragmentos que codificam as proteínas N45, N90, N135, N165, N185, N221, e N244 foram subclonados seqüencialmente em pET28a e pTZ18R (fragmentos codificantes para *nifA* dos plasmídeos pRAM1 e pRAM2 também foram subclonados em pTZ18R). A partir do vetor pT7-7, os fragmentos codificantes também foram transferidos para o vetor pLAFR3.18. Os clones em pT7-7 dessas mesmas variantes também foram usados para uma subclonagem seqüencial em vetor pDK6pnifA e pLAFR3.18, para poder transferir para esse último vetor variantes do gene *nifA* a jusante do promotor *nifA*. Um fluxograma geral representando essas clonagens é apresentado na figura 13.

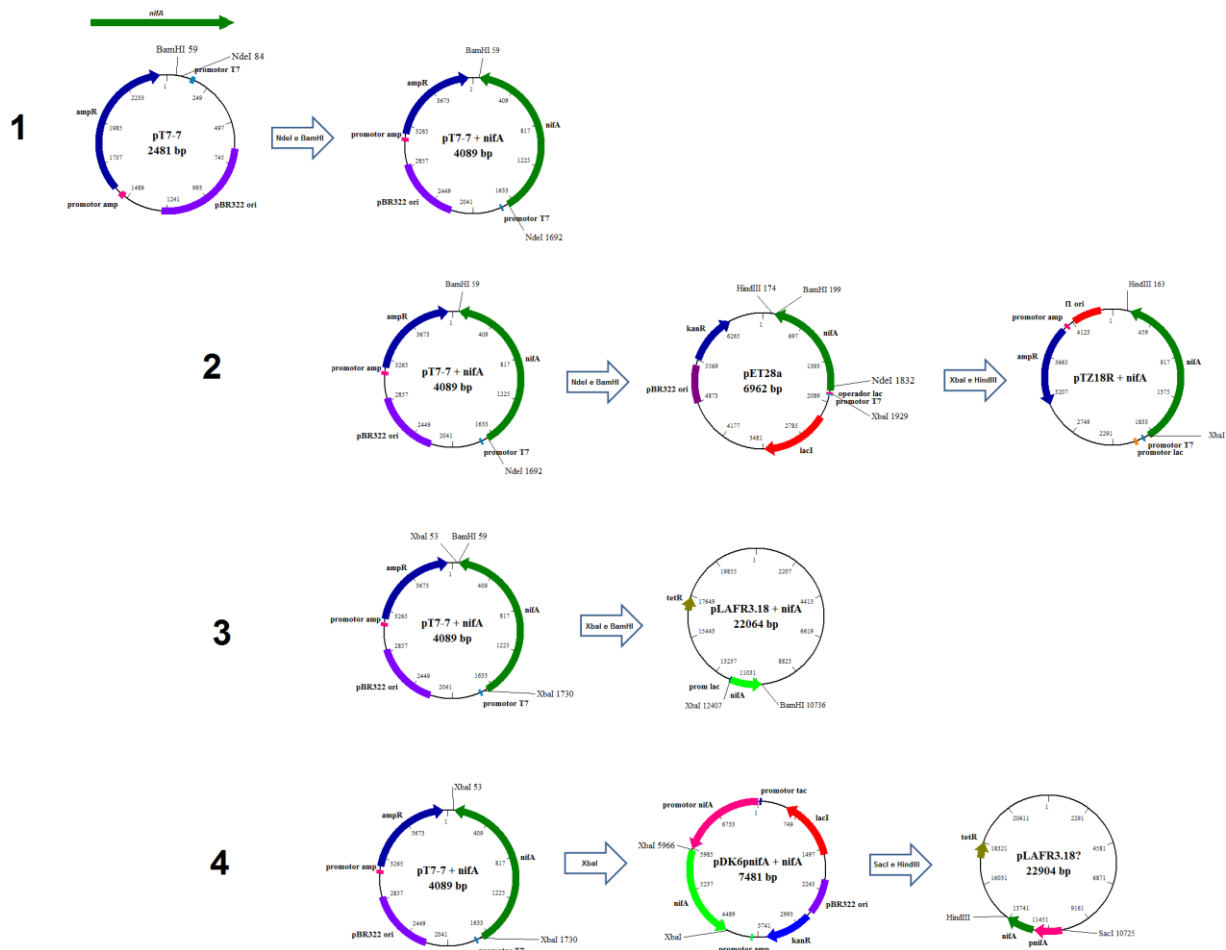


Figura 13 – Representação esquemática dos procedimentos de clonagem. Os fragmentos foram clonados inicialmente no vetor pT7-7 (1). A partir desse vetor, foram transferidos para pET28a, e depois para pTZ-18R (2). Foram também subclonados em pLAFR3.18 (3), e em pDK6pnifA, e depois pLAFR3.18 (4).

Essas etapas de clonagem foram feitas para que se pudesse expressar as variantes de *nifA* em vetores compatíveis com *E. coli* e *H. seropedicae*, e para que se pudesse fazer

expressão a partir de diferentes promotores (T7, *lac*, e *nifA*). A figura 14 traz uma representação esquemática da localização das variantes de *nifA* em cada plasmídeo:

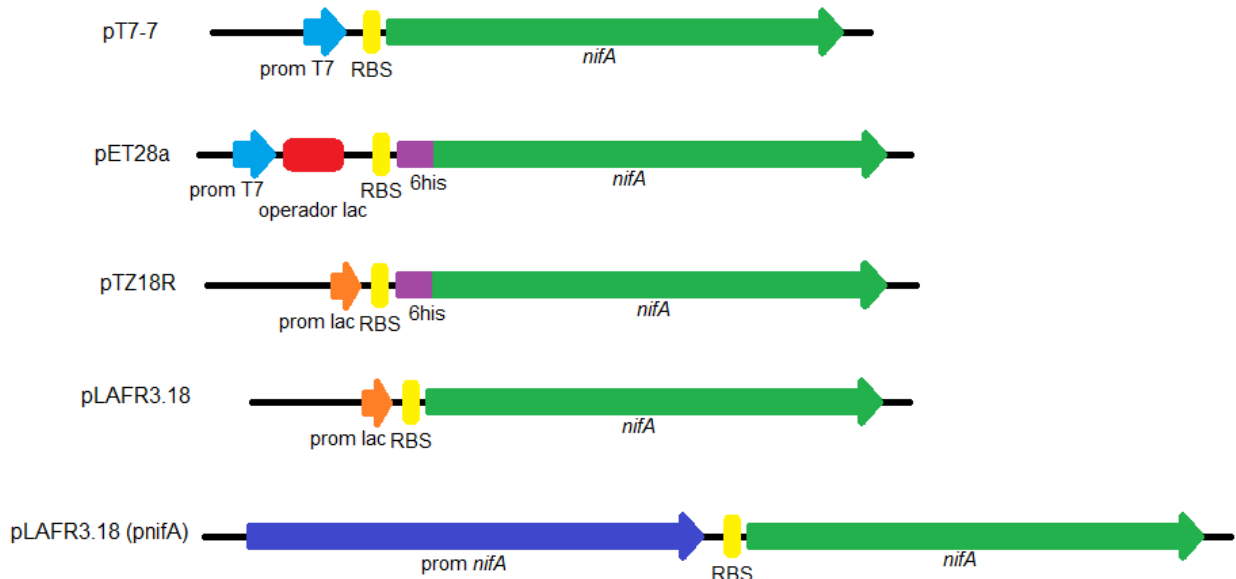


Figura 14 – Vizinhança do gene *nifA* nos plasmídeos construídos. As construções em pT7-7, pET28a, e pTZ18R foram usadas para a expressão das variantes em *E. coli*; as construções em pLAFR3.18 e pLAFR3.18pnifA foram usadas em *H. seropedicae*. O plasmídeo pDK6pnifA não é mostrado nessa figura porque foi útil apenas para a obtenção do plasmídeo pLAFR3.18(pnifA).

5.2.1. Clonagem das variantes de *nifA* em vetor pT7-7

Os fragmentos de DNA codificantes para variantes do gene *nifA* foram digeridos com as enzimas NdeI e BamHI, e então foram ligados ao vetor pT7-7 cortado com as mesmas enzimas. Um esquema das ligações é mostrado na figura 15.

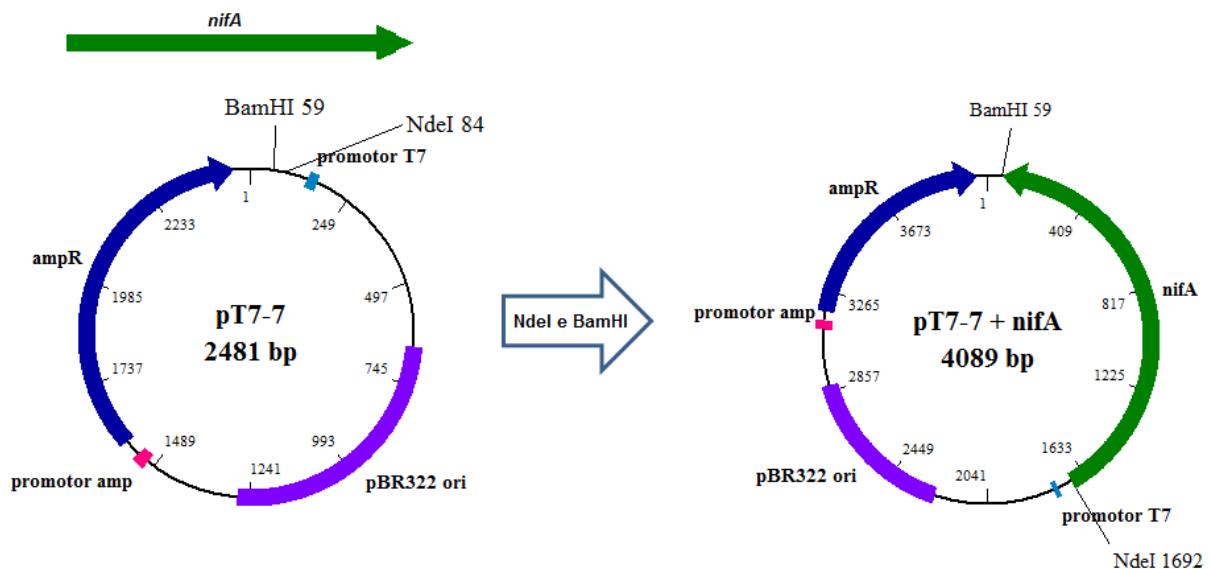


Figura 15 – Clonagem das variantes do gene *nifA* em vetor pT7-7. Os fragmentos de DNA obtidos nas reações de amplificação e o vetor pT7-7 foram digeridos com NdeI e BamHI, e ligados com T4 DNA ligase.

Produtos de ligação foram eletroporados em *E. coli* TOP10, e a presença de transformantes foi averiguada através do plaqueamento das células em meio LA contendo ampicilina. Colônias resistentes ao antibiótico foram cultivadas em meio LB para a extração de plasmídeos. A presença dos insertos de interesse foi verificada mediante restrição dos plasmídeos com a enzima XbaI, que flanqueia o sítio de policloneamento do vetor pT7-7.

As figuras 16 e 17 mostram as fotografias de géis de agarose 1% da restrição dos clones positivos com XbaI. Esses plasmídeos foram denominados pT7N45, pT7N90, pT7N135, pT7N165, pT7N185, pT7N218, pT7N244, pT7CC, pT7CC1, pT7CC2, e pT7CC3.

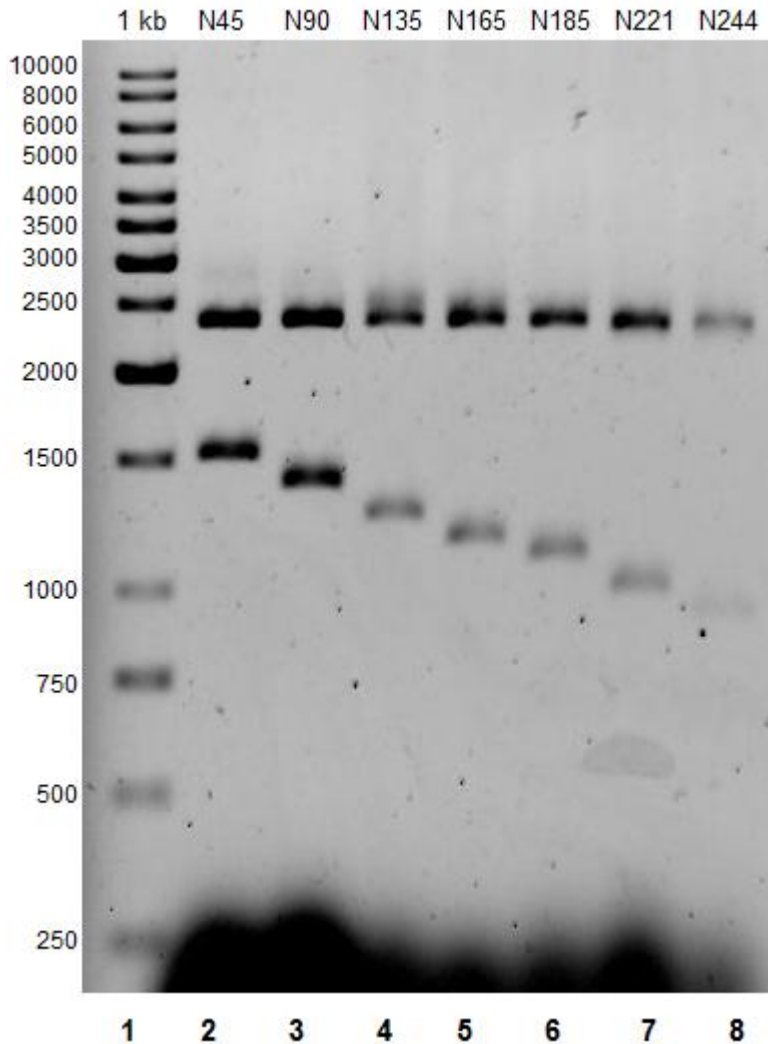


Figura 16 – Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pT7-7 contendo variantes do gene *nifA*. Linha (1), marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas). Linhas (2) a (8), produtos da restrição de pT7N45, pT7N90, pT7N135, pT7N165, pT7N185, pT7N218, e pT7N244 com XbaI. A banda de cerca de 2500 bp corresponde ao vetor pT7-7; as bandas de tamanho menor (>1500 – <1000 bp) correspondem aos insertos.

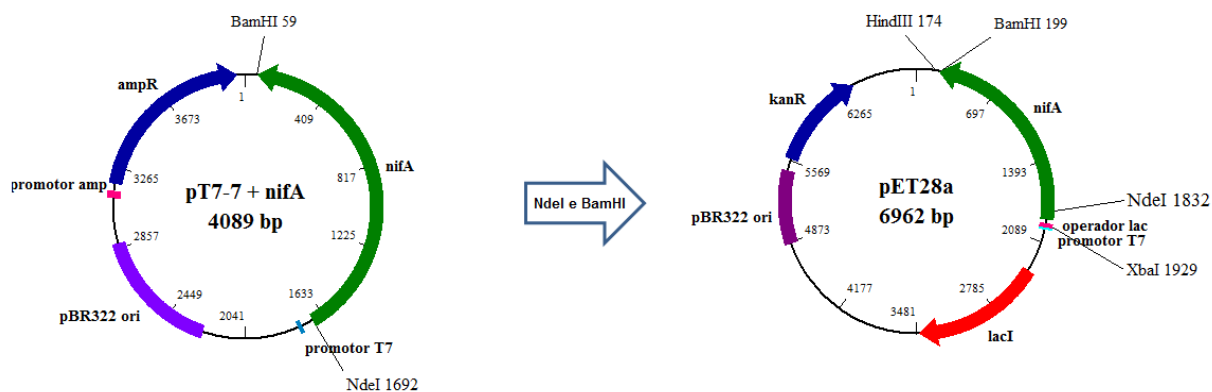


Figura 19 – Subclonagem das variantes de *nifA* em vetor para expressão em *E. coli*. Os insertos clonados em vetor pT7-7 foram removidos com as enzimas NdeI e BamHI, e clonados no vetor pET28a.

A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e os transformantes foram selecionados em meio LA contendo canamicina. Os clones foram identificados por meio de extração plasmidial e restrição dos plasmídeos com as enzimas XbaI e BamHI, como mostrados na figura 20. Esses plasmídeos foram nomeados pETN45, pETN90, pETN135, pETN165, pETN185, pETN218, e pETN244.

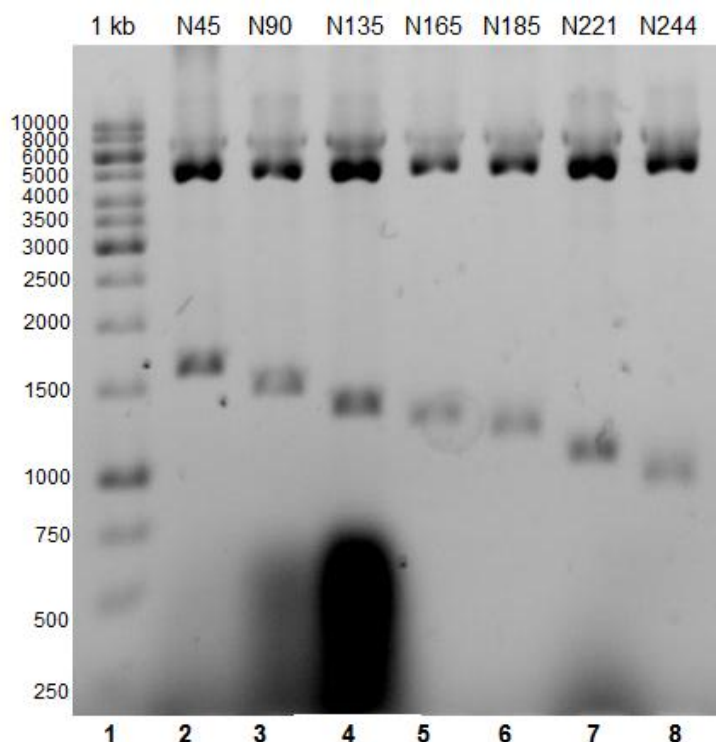


Figura 20 – Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pET28a contendo variantes do gene *nifA*. Linha (1), marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas). Linhas (2) a (8), produtos da restrição de pETN45, pETN90, pETN135, pETN165, pETN185, pETN218, e pETN244 com XbaI. A banda de cerca de 5000 bp corresponde ao vetor pET28a; as bandas de tamanho menor (>1500 – <1000 bp) correspondem aos insertos.

5.2.3. Subclonagem das variantes de *nifA* em vetor pTZ18R

Os plasmídeos pRAM1, pETN45, pETN90, pETN135, pETN165, pETN185, pETN218, pRAM2 e pETN244 foram digeridos com XbaI e HindIII, e ligados ao vetor pTZ18R cortado com as mesmas enzimas. Um esquema das ligações é mostrado na figura 21.

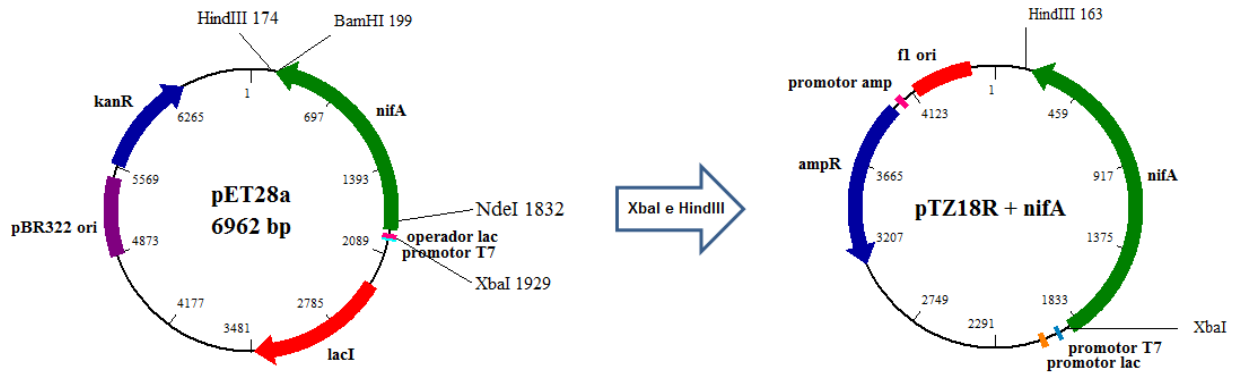


Figura 21 – Subclonagem das variantes de *nifA* em vetor para expressão em *E. coli*. Os insertos clonados em vetor pET28a foram removidos com as enzimas XbaI e HindIII, e clonados no vetor pTZ18R.

A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e os transformantes foram selecionados em meio LA contendo ampicilina. Os clones foram identificados por meio de extração plasmidial e restrição dos plasmídeos com as enzimas XbaI e HindIII, como mostrados na figura 22. Esses plasmídeos foram denominados pTZNifA, pTZN45, pTZN90, pTZN135, pTZN165, pTZN185, pTZN203, pTZN218, e pTZN244.

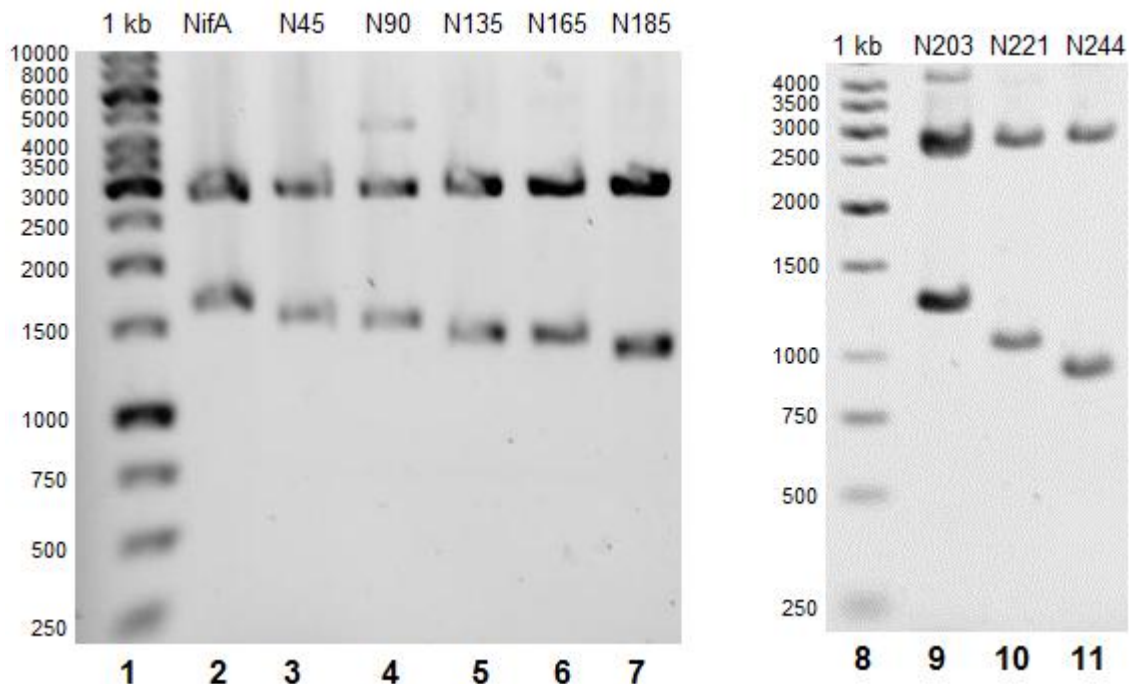


Figura 22 – Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pTZ18R contendo variantes do gene *nifA*. Linhas (1) e (8), marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas). Linhas (2) a (7) e (9) a (11), produtos da restrição de pTZNifA, pTZN45, pTZN90, pTZN135, pTZN165, pTZN185, pTZN203, pTZN218, e pTZN244 com XbaI. A banda de cerca de 3000 bp corresponde ao vetor pTZ18R; as bandas de tamanho menor (>1500 – <1000 bp) correspondem aos insertos.

5.2.4. Subclonagem das variantes de *nifA* em vetor pLAFR3.18

Os plasmídeos pT7N45, pT7N90, pT7N135, pT7N165, pT7N185, pT7N218, e pT7N244 foram digeridos com XbaI e BamHI, e ligados ao vetor pLAFR3.18 cortado com as mesmas enzimas. Um esquema das ligações é mostrado na figura 23.

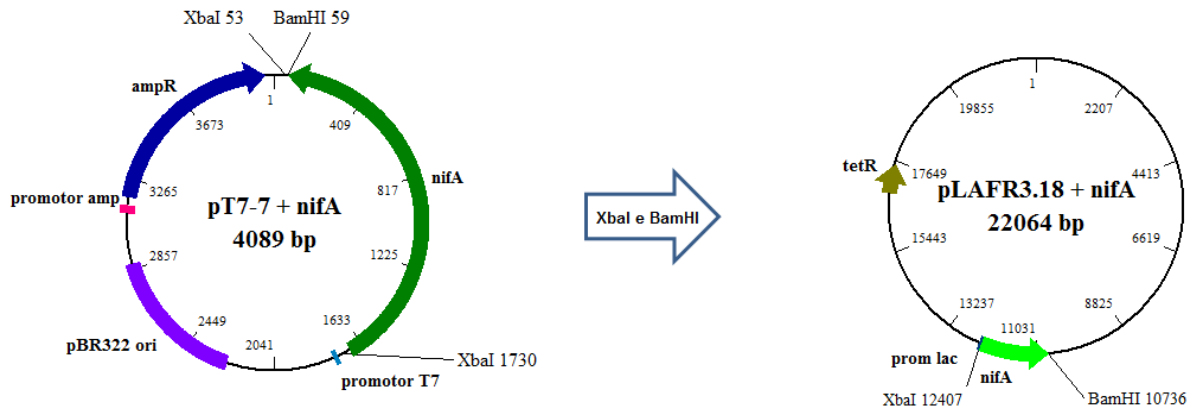


Figura 23 – Subclonagem das variantes de *nifA* em vetor para expressão em *H. seropedicae*. Os insertos clonados em vetor pT7-7 foram removidos com as enzimas XbaI e BamHI, e clonados no vetor pLAFR3.18 cortado com as mesmas enzimas.

A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e os transformantes foram selecionados em meio LA contendo tetraciclina. Os clones foram identificados por meio de extração plasmidial e restrição dos plasmídeos com as enzimas XbaI e BamHI, como mostrados na figura 24. Esses plasmídeos foram nomeados pLAFRN45, pLAFRN90, pLAFRN135, pLAFRN165, pLAFRN185, pLAFRN218, e pLAFRN244.

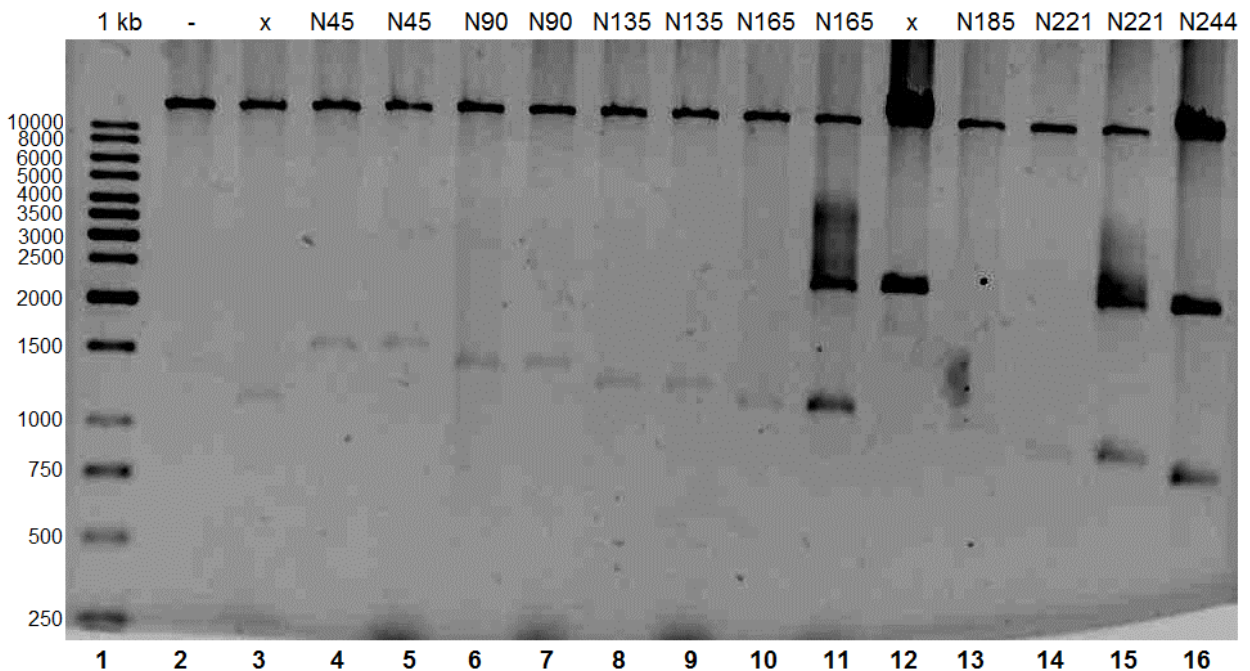


Figura 24 – Gel de agarose 1% da restrição dos clones de pLAFR3.18 contendo variantes do gene *nifA*. Linha (1), marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas). Linhas (2), (3), e (12), vetores vazios (indicado por [-]) ou com fragmentos de tamanho inesperado (indicado por [x]). Demais linhas, produtos da restrição de pLAFRN45, pLAFRN90, pLAFRN135, pLAFRN165, pLAFRN185, pLAFRN218, e pLAFRN244 com XbaI e BamHI. A banda de >10000 bp corresponde ao vetor pLAFR3.18; as bandas de tamanho menor (>1500 – <1000 bp) correspondem aos insertos.

5.2.5. Subclonagem das variantes de *nifA* à jusante do promotor *nifA*

A clonagem das variantes à jusante do promotor *nifA* foi feita em duas etapas: primeiramente, os fragmentos codificantes para as variantes de *nifA* foram subclonados no vetor pDK6pnifA, à jusante do referido promotor. Em seguida, fragmentos de DNA contendo o promotor *nifA* mais a variante do gene *nifA* foram subclonados no vetor pLAFR3.18, um plasmídeo que pode ser hospedado por diversas espécies de bactérias Gram-negativas, nisso incluso *H. seropedicae*. Um esquema disso é mostrado na figura 25:

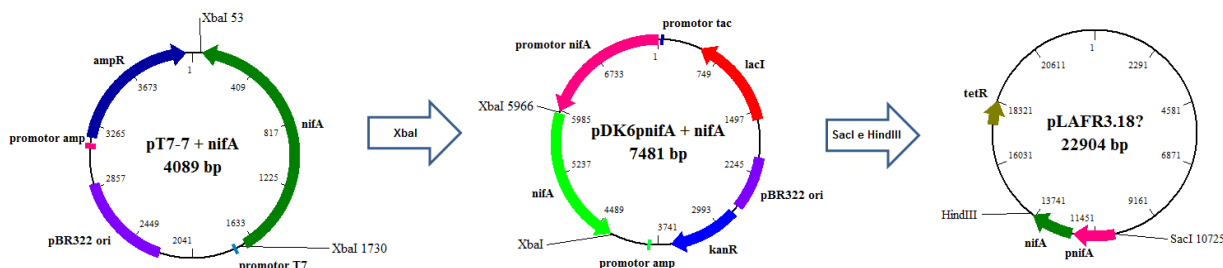


Figura 25 – Subclonagem das variantes de *nifA* em vetor para expressão em *H. seropedicae*. Os insertos clonados em vetor pT7-7 foram removidos com a enzima XbaI, e clonados no vetor pDK6pnifA. Depois, os clones em pDK6pnifA foram digeridos com SacI e HindIII, e seus insertos (contendo as variantes de *nifA* a jusante do promotor *nifA*) foram transferidos para o vetor pLAFR3.18.

5.2.5.1. Subclonagem em vetor pDK6pnifA

Os plasmídeos pRAM1T7, pT7N45, pT7N90, pT7N135, pT7N165, pT7N185, pT7N218, e pT7N244 foram digeridos com XbaI; em seqüência, os sistemas de reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose LMP 0,8% para separação dos fragmentos de inserto e vetor. O gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado sob iluminação com UVB (302 nm), e as bandas correspondentes aos fragmentos do gene *nifA* foram recortadas do gel e extraídas do gel de agarose com o kit Illustra Gfx. Esses fragmentos purificados foram ligados ao vetor pDK6pnifA linearizado com a enzima XbaI. A ligação foi eletroporada em *E. coli* TOP10, e os transformantes foram selecionados em meio LA contendo canamicina. Colônias resistentes ao antibiótico foram cultivadas em meio LB, a partir delas se fez a extração dos plasmídeos.

Uma vez que essa etapa de clonagem utilizou fragmentos de DNA cortados com apenas uma enzima de restrição, espera-se que os fragmentos possam ter se ligado em duas orientações possíveis. Isso faz com que a seleção dos clones tenha que ser feita de maneira a determinar (1) a presença do inserto de interesse e (2) a orientação desse inserto em relação ao vetor. Essas exigências foram supridas com a restrição dos possíveis clones com as enzimas de restrição XbaI e PstI, separadamente. A restrição com XbaI permite confirmar a presença do inserto de tamanho adequado; já a restrição com PstI confirma a orientação desse inserto. Tanto o gene *nifA* quanto o vetor pDK6pnifA possuem (cada um) um sítio de restrição para PstI, localizado na porção 3' de *nifA* e na porção 3' do sítio de policlonagem, respectivamente. A orientação correta do inserto em relação ao vetor contém esses dois sítios

muito próximos entre si, de modo que a restrição desses clones gera apenas uma banda detectável em um gel de agarose 1%. A figura 26 é uma esquematização desse sistema de seleção dos clones positivos; a figura 27, por sua vez, mostra o resultado da eletroforese das restrições desses clones:

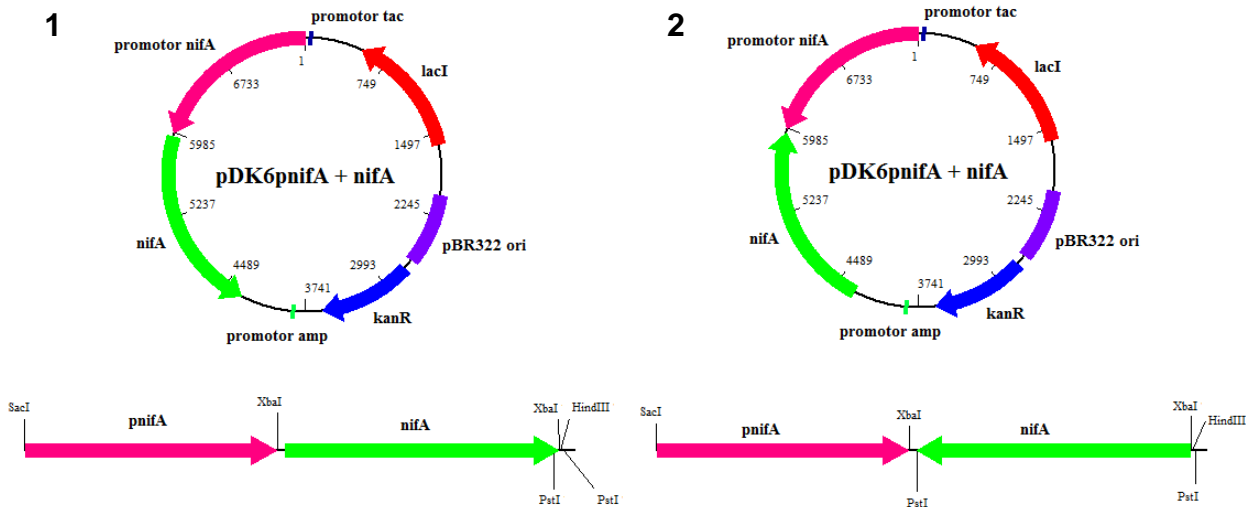


Figura 26 – Representação das duas orientações possíveis do inserto clonado com XbaI no vetor pDK6pnifA. (1) Orientação correta do inserto em relação ao promotor *nifA*; os sítios de restrição para PstI estão próximos. (2) Orientação incorreta do inserto em relação ao promotor *nifA*; os sítios de restrição para PstI estão distantes.

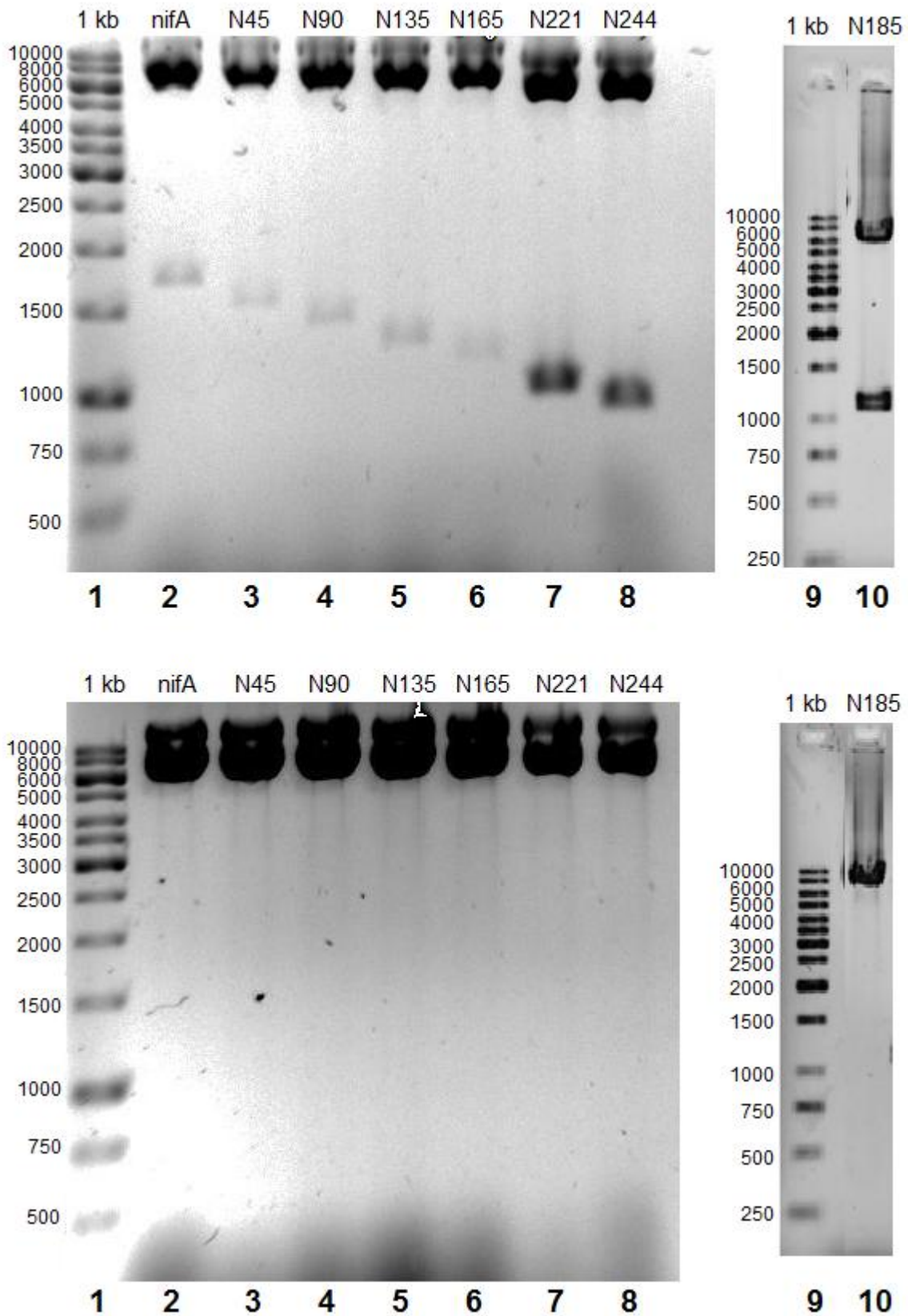


Figura 27 – Restrição dos clones das variantes de *nifA* em pDK6pnifA com XbaI (géis superiores) e com PstI (géis inferiores). (1), e (9) são marcadores de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas); as demais linhas contém cada qual uma variante de *nifA*.

5.2.5.2. Subclonagem em vetor pLAFR3.18

Os plasmídeos obtidos na etapa de clonagem anterior (5.2.5.1) foram digeridos com as enzimas *SacI* e *HindIII*, e subclonados no vetor pLAFR3.18 linearizado com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e os transformantes foram selecionados em meio LA contendo tetraciclina. Os clones foram identificados por meio de extração plasmidial e restrição dos plasmídeos com as enzimas *SacI* e *HindIII*, como mostrados na figura 28:

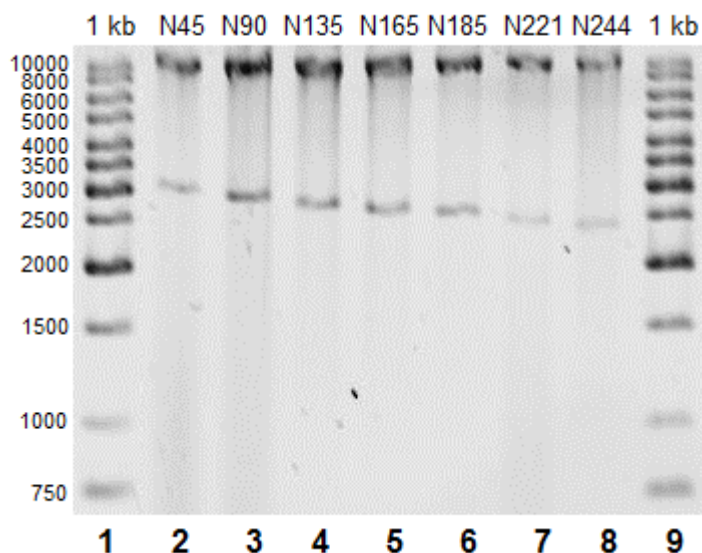


Figura 28 – Restrição dos clones das variantes de *nifA* em pLAFR3.18(*pnifA*) com *SacI* e *HindIII*. (1) e (9) são marcadores de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas); as demais linhas contêm cada qual uma variante de *nifA* clonada à jusante do promotor *nifA* (tamanho variando entre 3500 e 4000 bp).

Os plasmídeos que liberaram insertos de tamanho apropriado foram nomeados *ppnifANifA*, *ppnifAN45*, *ppnifAN90*, *ppnifAN135*, *ppnifAN165*, *ppnifAN185*, *ppnifAN203*, *ppnifAN218*, e *ppnifAN244*.

5.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS VARIANTES DE *NifA* EM *E. coli*

A atividade das variantes de *NifA* foi medida indiretamente em *E. coli* através do método de Miller (1972), no qual uma proteína ativadora transcricional (no caso, *NifA*) ativa a transcrição da enzima β -galactosidase; quanto maior for atividade de β -galactosidase detectada em uma cultura de células expressando o ativador transcricional, tanto maior será a atividade deste. Para esses experimentos, células de *E. coli* JM109 e ET8000 (estirpes que não possuem atividade de β -galactosidase) foram transformadas com o plasmídeo pRT22 (TULI e MERRICK, 1988), que expressa o gene *lacZ* a partir do promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae*, e com plasmídeos que expressam variantes do gene *nifA*. Os resultados são descritos abaixo.

5.3.1. Atividade de β -galactosidase em *E. coli* JM109 pRT22

5.3.1.1. Atividade das variantes de NifA expressas a partir do vetor pT7-7

Células de *E. coli* JM109 contendo o plasmídeo pRT22 foram transformadas com os plasmídeos pRAM1T7, pT7N45, pT7N90, pT7N135, pT7N165, pT7N185, pRAM2T7, pT7N218, pT7N244, pT7CC, pT7CC1, pT7CC2, e pT7CC3, e usadas para determinação de atividade de β -galactosidase. Nesse sistema, as variantes de NifA são superexpressas a partir do promotor T7, e por isso se espera observar atividade mesmo na eventualidade de uma dessas variantes ser pouco ativa. Os resultados obtidos são sumarizados na figura 29; os valores correspondem à média de ao menos cinco experimentos independentes.

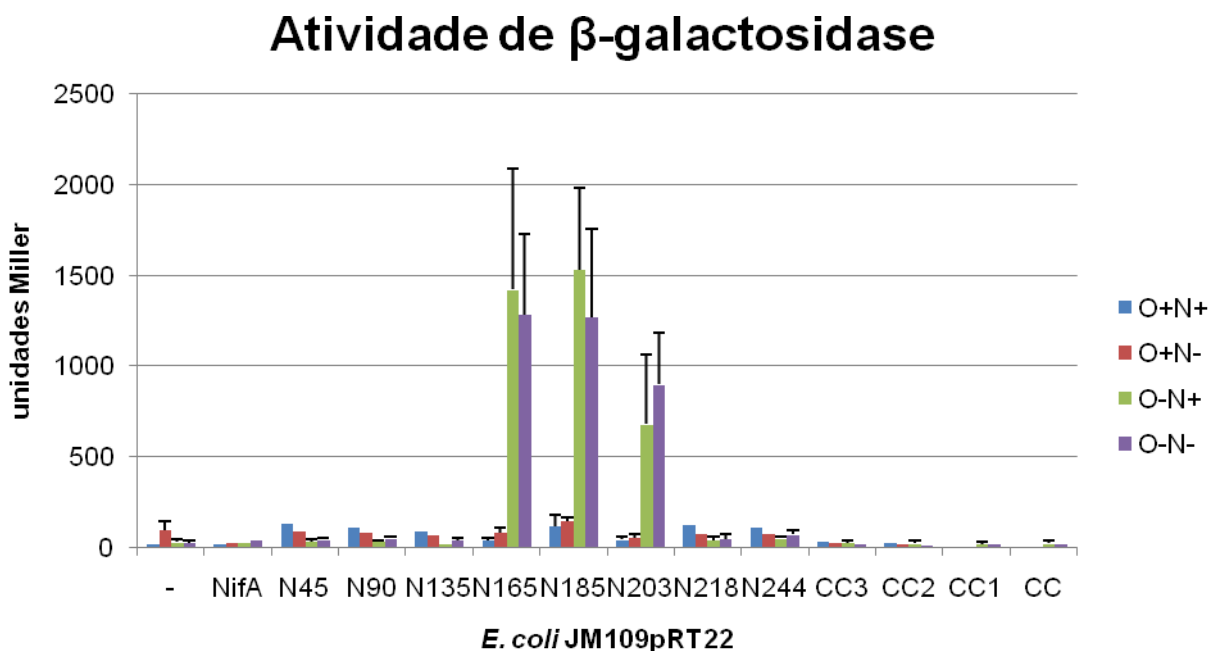


Figura 29 – atividade de β -galactosidase das variantes de NifA expressas a partir de pT7-7 em *E. coli* JM109 pRT22. As barras coloridas representam a atividade em 21% O₂ e 20 mM NH₄Cl (O+N+), 21% O₂ e 0 mM NH₄Cl (O+N-), ~0% O₂ e 20 mM NH₄Cl (O-N+), e ~0% O₂ e 0 mM NH₄Cl (O-N-). As linhas acima das barras correspondem ao desvio padrão. O sinal [-] indica a estirpe JM109 pRT22 usada como controle negativo.

Após a medição de atividade, 500 μ L de cada cultura foram fervidos, e uma amostra de cada extrato foi analisada por SDS-PAGE para verificar a expressão das proteínas. A figura 30 mostra o resultado de um desses géis.

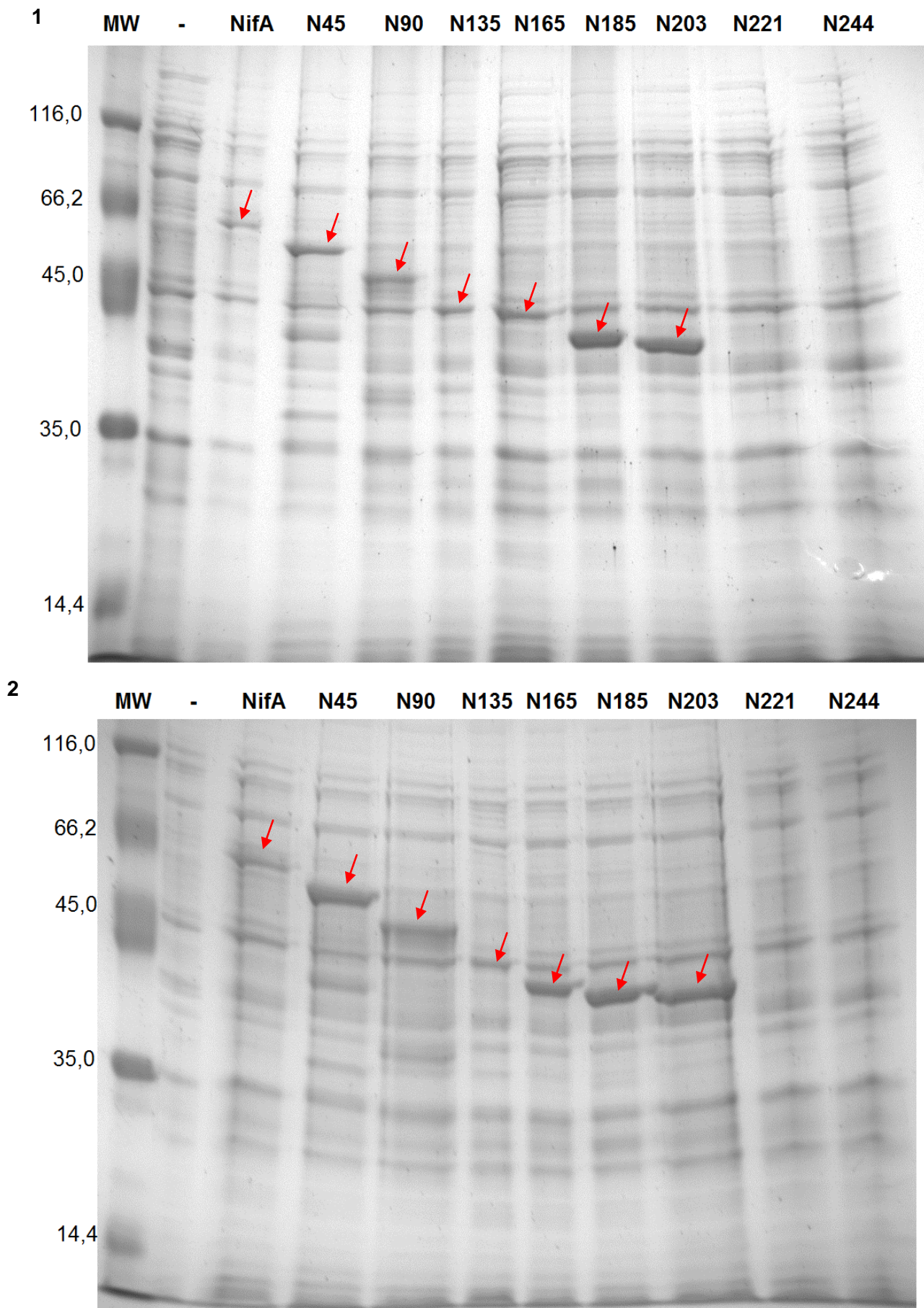


Figura 30 – Gel SDS-PAGE de extratos de *E. coli* JM109 pRT22 expressando variantes de NifA a partir do plasmídeo pT7-7. (1) Células cultivadas em 0% O₂ e 20 mM de NH₄Cl. (2) Células cultivadas em 0%

O₂ e 0 mM de NH₄Cl. O sinal [-] indica a estirpe JM109 pRT22 usada como controle negativo. Cada linha contém 5 µg de proteína total.

As proteínas CC, CC1, CC2, e CC3 também foram observadas após eletroforese dos extratos em gel de poliacrilamida, conforme mostra a figura 31:

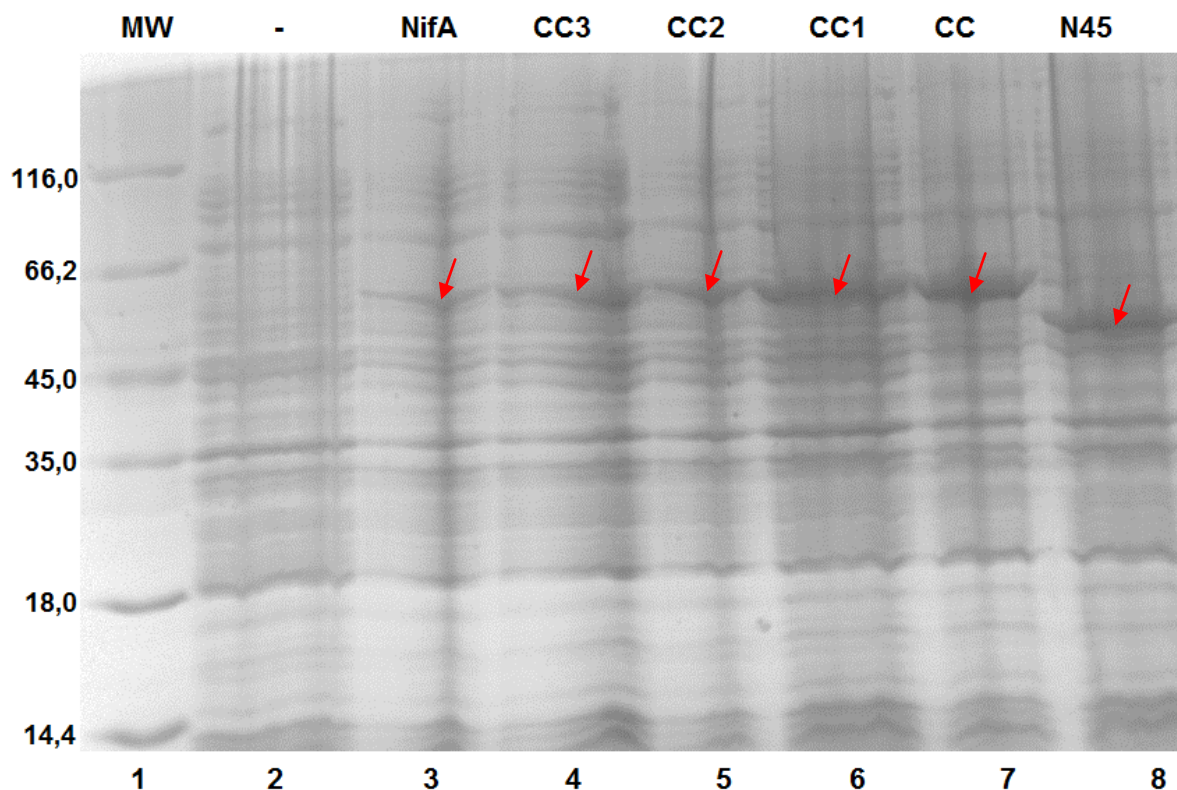


Figura 31 – Gel SDS-PAGE de extratos de *E. coli* JM109 pRT22 expressando variantes de NifA a partir do plasmídeo pT7-7. As células foram cultivadas em 0% O₂ e 0 mM de NH₄Cl. O sinal [-] indica a estirpe JM109 pRT22 usada como controle negativo.

Os resultados obtidos com a determinação de atividade das variantes permitem algumas considerações. Abordando primeiramente as proteínas N-truncadas, nota-se que apenas as variantes N165, N185 e N203 são ativas em *E. coli*, e não sofrem regulação por amônio. A atividade de N203 (NifA N-truncada) já foi reportada devidamente discutida em trabalhos anteriores (MONTEIRO et al., 1999). A atividade de N185 não é de todo inesperada, uma vez que a diferença entre N203 e N185 é somente a presença do Q-linker, um domínio protéico relativamente comum em ativadores transcricionais de bactérias (WOOTTON e DRUMMOND, 1989) ao qual jamais se atribuiu função inibitória, mas sim função de união entre dois domínios (WOOTTON e DRUMMOND, 1989). A atividade de N165, por outro lado, atrai maior interesse, pois essa proteína possui os vinte aminoácidos finais do domínio N-terminal. Sua atividade não regulada em *E. coli* indica que essa pequena porção do domínio N-terminal não está envolvida na inibição de NifA pelo domínio GAF; isso é semelhante ao que foi encontrado quando da construção de variantes N-truncadas de NifA e *A. brasilense* (ARSÈNE, et al., 1996). Pode-se especular ainda que, uma vez que N135 não é ativa em *E. coli* (tal qual a proteína NifA selvagem), a região entre os aminoácidos 135 e 165 seria importante para a

inibição de NifA. Considerando o modelo de regulação de NifA por interação entre seus domínios modulares (proposto por (MONTEIRO et al., 1999)), os aminoácidos 135 – 165 poderiam conter a região de interação entre os domínios N-terminal e central.

Observa-se também que as proteínas CC, CC1, CC2, e CC3 não foram ativas em *E. coli* em nenhuma das condições testadas, e isso pode ter ocorrido por duas razões. Primeiramente, é possível que uma ou mais dessas variantes tenha um enovelamento incorreto, que a torna intrinsecamente inativa mesmo em condições favoráveis; nesse caso, pode-se concluir que a remoção de partes do Q-linker é danosa para a correta estruturação do polipeptídeo. Por outro lado, é possível que essas proteínas estejam com uma estrutura tridimensional correta, mas tenham em *E. coli* o mesmo comportamento de NifA selvagem: estão permanentemente inibidas. Nesse caso, a alteração do Q-linker pode não ter tido qualquer efeito sobre a proteína, ou pode ter causado uma inibição permanente.

Também se pode ressaltar que nenhuma das proteínas perdeu a sensibilidade a oxigênio, o que está de acordo com o modelo comumente aceito, em que essa sensibilidade seria devida ao motivo de cisteínas no final do domínio central. A modificação do domínio N-terminal aparentemente não afetou o domínio central, que manteve sua atividade catalítica.

5.3.1.2. Atividade das variantes de NifA expressas a partir do vetor pET28a

Também foi determinada a atividade de β -galactosidase de *E. coli* JM109 pRT22 transformada com os plasmídeos pRAM1, pETN45, pETN90, pETN135, pETN165, pETN185, pRAM2, pETN218, e pETN244. Nesse sistema, as variantes de NifA são superexpressas a partir do promotor T7 com forte regulação do operador *lac*, o que diminui muito o escape de expressão antes da adição do indutor (IPTG). Os resultados obtidos estão mostrados na figura 32; os valores correspondem à média de três experimentos independentes.

Atividade de β -galactosidase

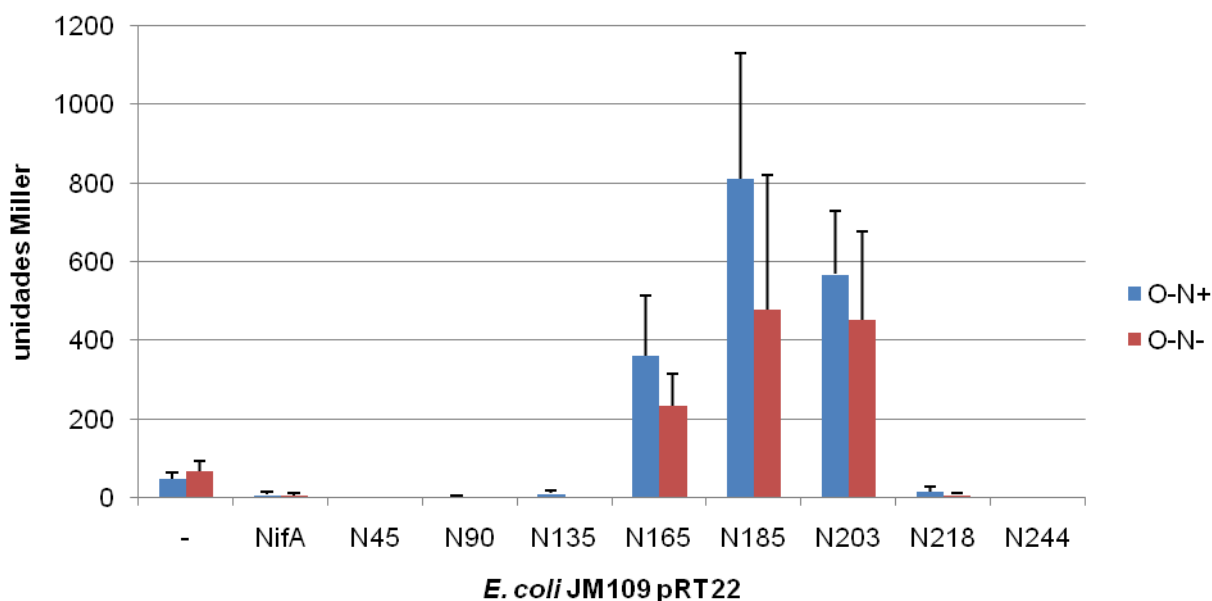


Figura 32 – atividade de β -galactosidase de variantes de NifA expressas a partir de pET28a em *E. coli* JM109 pRT22. As barras coloridas representam a atividade em ~0% O₂ e 20 mM NH₄Cl (O-N+), e ~0% O₂ e 0 mM NH₄Cl (O-N-). As linhas acima das barras correspondem ao desvio padrão. O sinal [-] indica a estirpe ET8000 pRT22 usada como controle negativo.

Os resultados de atividade das variantes N-truncadas expressas a partir do vetor pET28a se assemelham muito aos obtidos com a expressão dessas proteína a partir do vetor pT7-7. A diferença consiste nos valores obtidos para essa atividade, que são em cerca de metade quando a expressão é feita a partir do vetor pET28a. Tal poderia ser devido a um efeito de desestruturação promovido pela presença da cauda de histidinas, mas parece mais provável que seja o efeito de diferença de expressão das proteínas quando clonadas em cada plasmídeo.

5.3.2. Atividade de β -galactosidase em *E. coli* ET8000 pRT22

Células de *E. coli* ET8000 contendo o plasmídeo pRT22 foram transformadas com os plasmídeos pTZNifA, pTZN45, pTZN90, pTZN135, pTZN165, pTZN185, pTZN203, pTZN218, e pTZN244, e usadas para determinação de atividade da β -galactosidase. As variantes de NifA clonadas no vetor pTZ18R são expressas constitutivamente a partir do promotor lac de *E. coli*, numa situação mais próxima à expressão fisiológica de proteínas na célula. Os resultados obtidos são sumarizados na figura 33; os valores correspondem à média de ao menos cinco experimentos independentes.

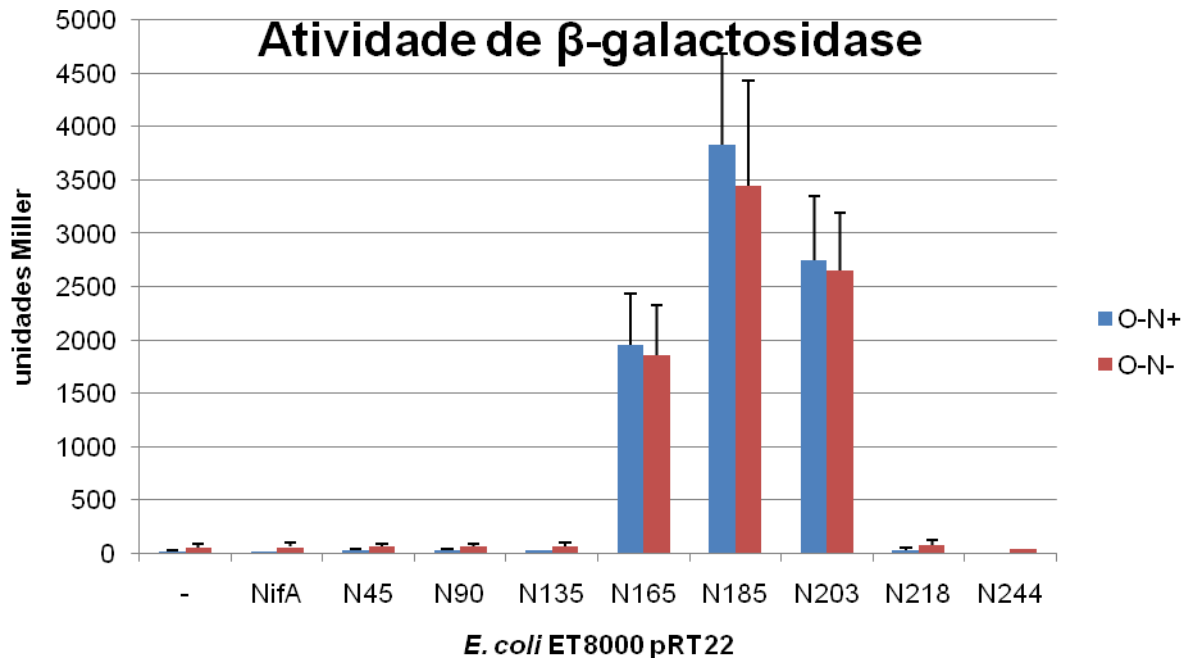


Figura 33 – atividade de β -galactosidase de variantes de NifA expressas a partir de pTZ18R em *E. coli* ET8000 pRT22. As barras coloridas representam a atividade em ~0% O₂ e 20 mM NH₄Cl (O-N+), e ~0% O₂ e 0 mM NH₄Cl (O-N-). As linhas acima das barras correspondem ao desvio padrão.

Após a medição de atividade, 500 μ L de cada cultura foram fervidos, e uma amostra de cada extrato foi analisada por SDS-PAGE para verificar a expressão das proteínas. A figura 34 mostra o resultado de um desses géis:

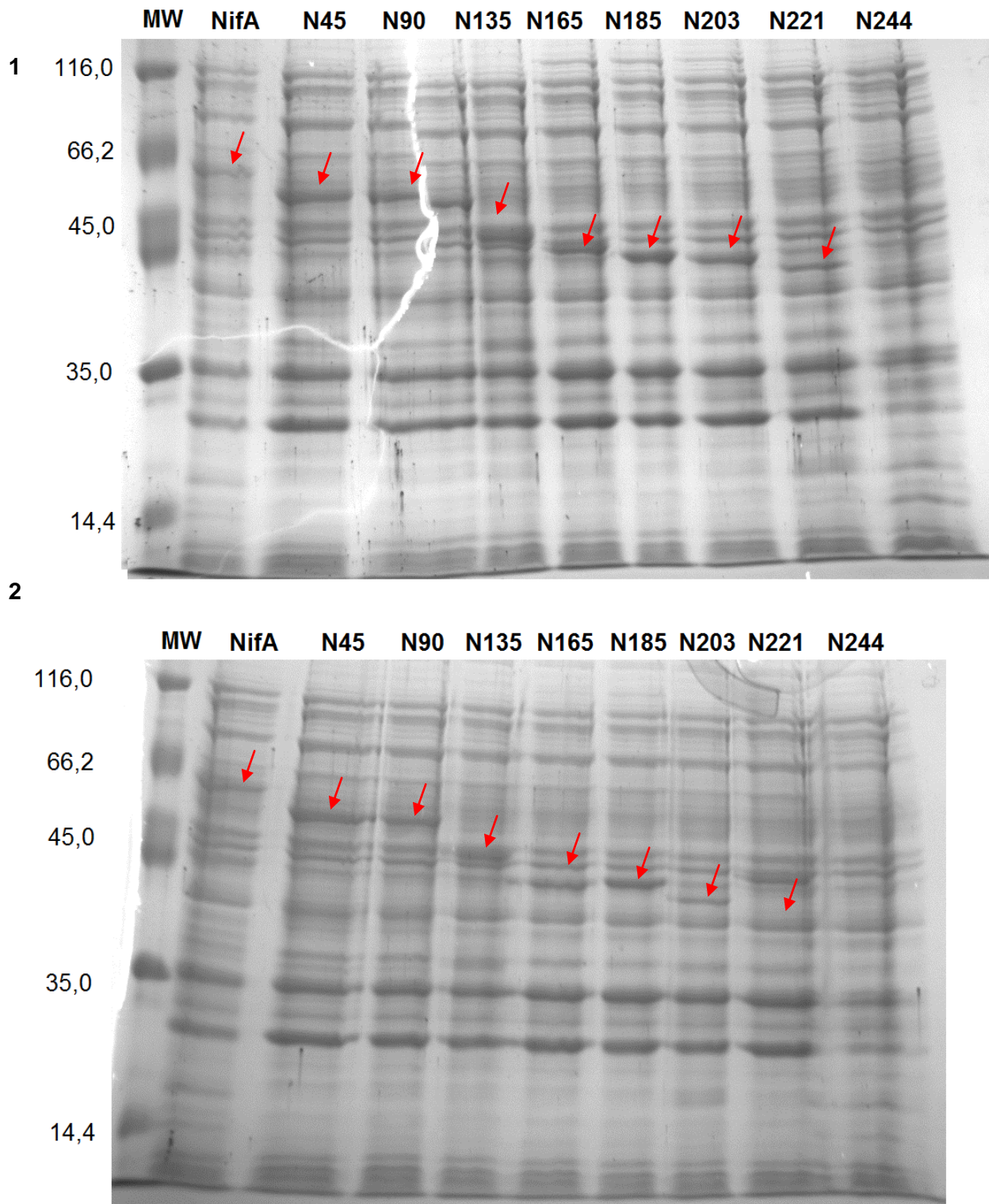


Figura 34 – Gel SDS-PAGE de extratos de *E. coli* ET8000 pRT22 expressando variantes de NifA a partir do plasmídeo pTZ18R. (1) Células cultivadas em ~0% O₂ e 20 mM de NH₄Cl. (2) Células cultivadas em 0% O₂ e 0 mM de NH₄Cl. Cada linha contém 3 µg de proteína total.

5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS VARIANTES DE NifA EM *H. seropedicae*

A atividade das variantes de NifA em *H. seropedicae* foi determinada de duas maneiras diferentes. Foram feitas medições de atividade de β -galactosidase em estirpes de *H. seropedicae* *nifA*⁻, *glnK*, e *nifA*⁻ *glnK* que continham uma fusão cromossomal *nifH*(*H. seropedicae*)::*lacZ* (gentilmente cedidos por Bruno Aquino). Paralelamente, as mesmas variantes foram expressas em estirpes *nifA*⁻ e *glnK* (sem fusão cromossomal *nifH*::*lacZ*) e foi averiguada sua capacidade de complementar o fenótipo mutante Fix⁻ (que as duas estirpes apresentam).

Nos ensaios de atividade da nitrogenase, as variantes de NifA foram expressas em *H. seropedicae* a partir dos promotores *lac* e *nifA*; a expressão a partir do promotor *lac* é eficiente para a produção de NifA inteira em *H. seropedicae*, mas aparentemente não é suficiente para a detecção de atividade de NifA N-truncada (N203) (NOINDORF, 2006). A expressão a partir do promotor *nifA*, por outro lado, é mais próxima à expressão fisiológica dessa proteína em *H. seropedicae* (já que o promotor *nifA* é o promotor nativo do gene *nifA* em *H. seropedicae*).

5.4.1. Atividade de nitrogenase de *H. seropedicae* *nifA*⁻ e *glnK* complementados com as variantes de *nifA*

5.4.1.1. Expressão das variantes de NifA a partir do promotor *lac*.

Os plasmídeos pRAMM1, pLAFRN45, pLAFRN90, pLAFRN135, pLAFRN165, pLAFRN185, pLAFRN221, e pLAFRN244 foram transformados em *E. coli* S17-1. Colônias resistentes a tetraciclina foram cultivadas em meio LB e utilizadas para a transferência dos plasmídeos por conjugação para *H. seropedicae* SmR54 (*nifA*⁻), LN*glnK*del (*glnK*). Colônias transformantes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato HPN, e mantidas em meio NFb-malato HPN semi-sólido contendo estreptomicina e tetraciclina (e kanamicina, no caso de transformantes de SmR54).

A medição da atividade da nitrogenase foi feita por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos de ao menos cinco experimentos independentes estão mostrados na figura 35:

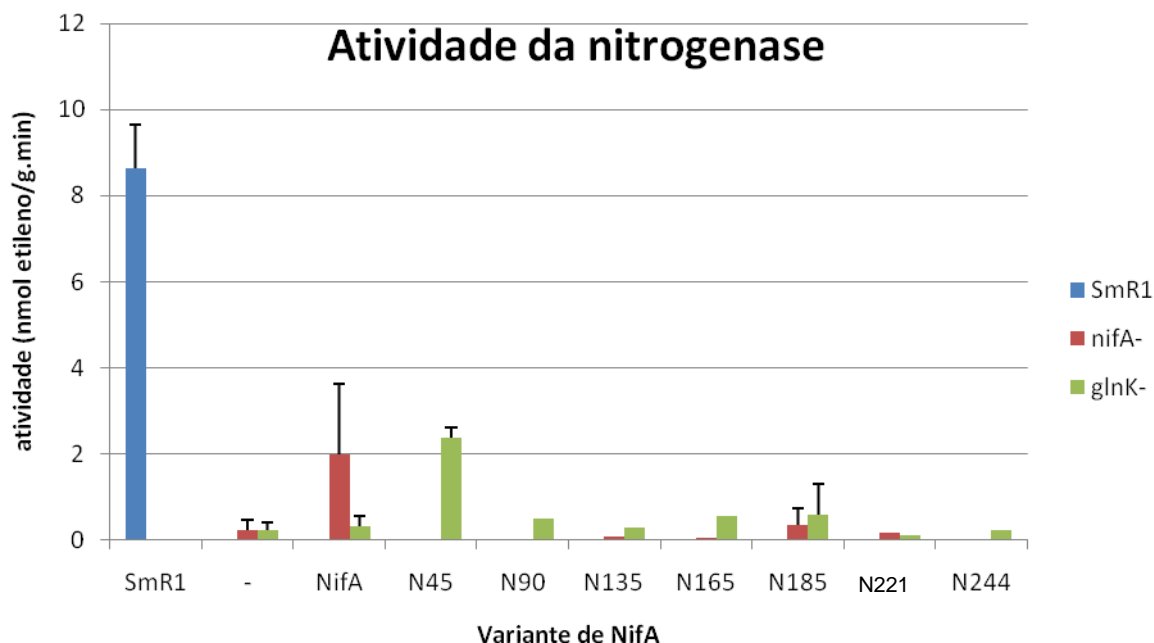


Figura 35 – atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* SmR54 (*nifA*⁻) e LNglNkdel (*glnK*) expressando variantes de *nifA* a partir do vetor pLAFR3.18. O controle positivo SmR1 (em azul) é a estirpe selvagem de *H. seropedicae*. As linhas acima das barras correspondem ao desvio padrão.

Segundo os resultados obtidos, N165 e N185 não apresentam atividade em *H. seropedicae*, o que é pouco provável dada sua atividade em *E. coli*. É preciso considerar, porém, que o promotor *lac* não parece ser adequado para a expressão de variantes de NifA em *H. seropedicae*; a variante N203 não é ativa em *H. seropedicae* quando expressa a partir dele, mas é perfeitamente funcional quando clonada a jusante do próprio promotor *nifA* (NOINDORF, 2006). Assim, esse resultado negativo é provavelmente devido a problemas de expressão.

A atividade parcial de N45 (que merece maior atenção) é discutida na próxima seção.

5.4.1.2. Expressão das variantes de NifA a partir do promotor *nifA*

Também foi feita a complementação do fenótipo Fix⁻ com as mesmas variantes de NifA expressas a partir de seu próprio promotor.

Os plasmídeos ppnifANifA, ppnifAN45, ppnifAN90, ppnifAN135, ppnifAN165, ppnifAN185, ppnifAN203, ppnifAN218, e ppnifAN244 foram transformados em *E. coli* S17-1. Colônias resistentes a tetraciclina foram cultivadas em meio LB e utilizadas para a transferência dos plasmídeos por conjugação para *H. seropedicae* SmR54 (*nifA*⁻), LNglNkdel (*glnK*). Colônias transformantes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato HPN, e mantidas em meio NFb-malato HPN semi-sólido contendo estreptomicina e tetraciclina (e kanamicina, no caso de transformantes de SmR54).

Para garantir que os resultados obtidos não seriam devidos à contaminação das culturas por outras espécies de bactérias, uma amostra de cada cultura foi usada para

amplificação de DNA 16S de cada cultura. A figura 36 mostra um gel de agarose 1% contendo os produtos dessas amplificações.

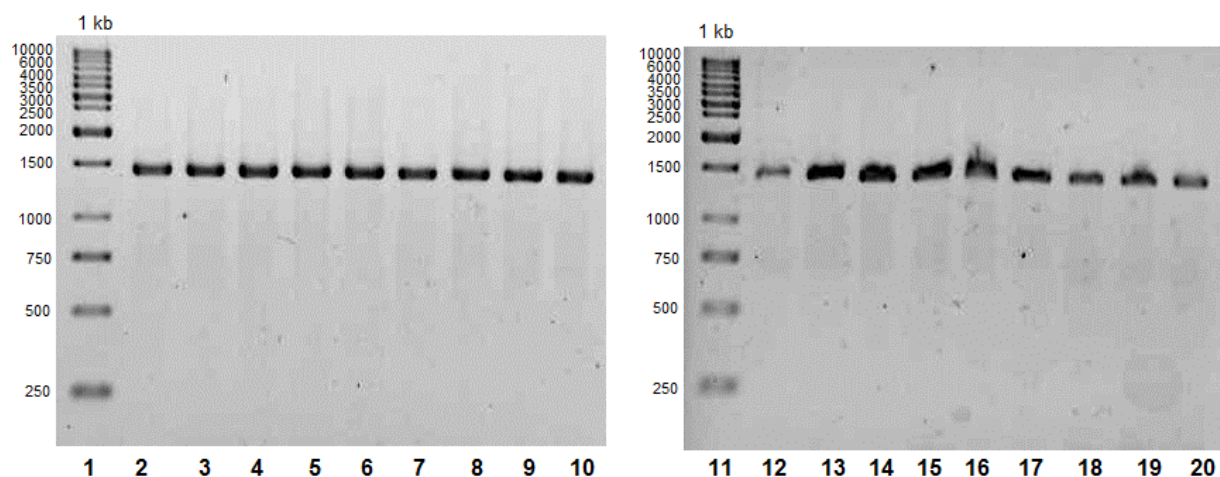


Figura 36 – amplificação do gene 16S de culturas de *H. seropedicae* SmR54 (hospedando os plasmídeos ppnifANifA, ppnifAN45, ppnifAN90, ppnifAN135, ppnifAN165, ppnifAN185, ppnifAN221, e ppnifAN244), e LNglNkdel (hospedando os plasmídeos ppnifANifA, ppnifAN45, ppnifAN90, ppnifAN135, ppnifAN165, ppnifAN185, ppnifAN221, e ppnifAN244), usando os primers Y1 e Y3. Linhas (1) e (11), marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas).

A amostra de DNA 16S foi posteriormente digerida com a enzima HaeIII, e os sistemas de restrição foram então analisados em gel de agarose 2% (figura 37). A comparação do padrão de bandas gerado com o esperado pela seqüência dessa região obtida do genoma de *H. seropedicae* (PEDROSA et al., 2011) assegurou que não houve contaminação detectável dos inóculos.

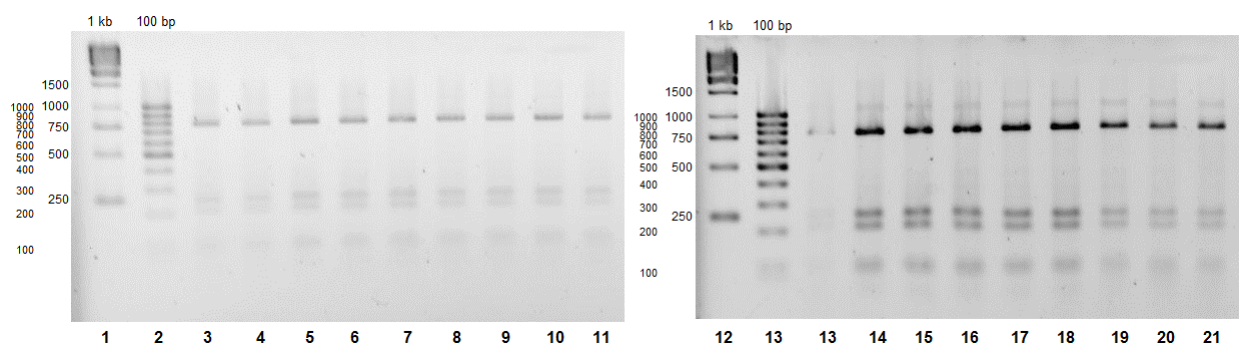


Figura 37 – restrição do gene 16S de culturas de *H. seropedicae* SmR54 (hospedando os plasmídeos ppnifANifA, ppnifAN45, ppnifAN90, ppnifAN135, ppnifAN165, ppnifAN185, ppnifAN221, e ppnifAN244), e LNglNkdel (hospedando os plasmídeos ppnifANifA, ppnifAN45, ppnifAN90, ppnifAN135, ppnifAN165, ppnifAN185, ppnifAN221, e ppnifAN244) com a enzima HaeIII. Linhas (1) e (2), marcadores de tamanho molecular GeneRuler™ 1kb DNA ladder e 100 bp ladder (Fermentas), respectivamente.

A medição da atividade da nitrogenase foi feita por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos de ao menos cinco experimentos independentes estão mostrados na figura 38:

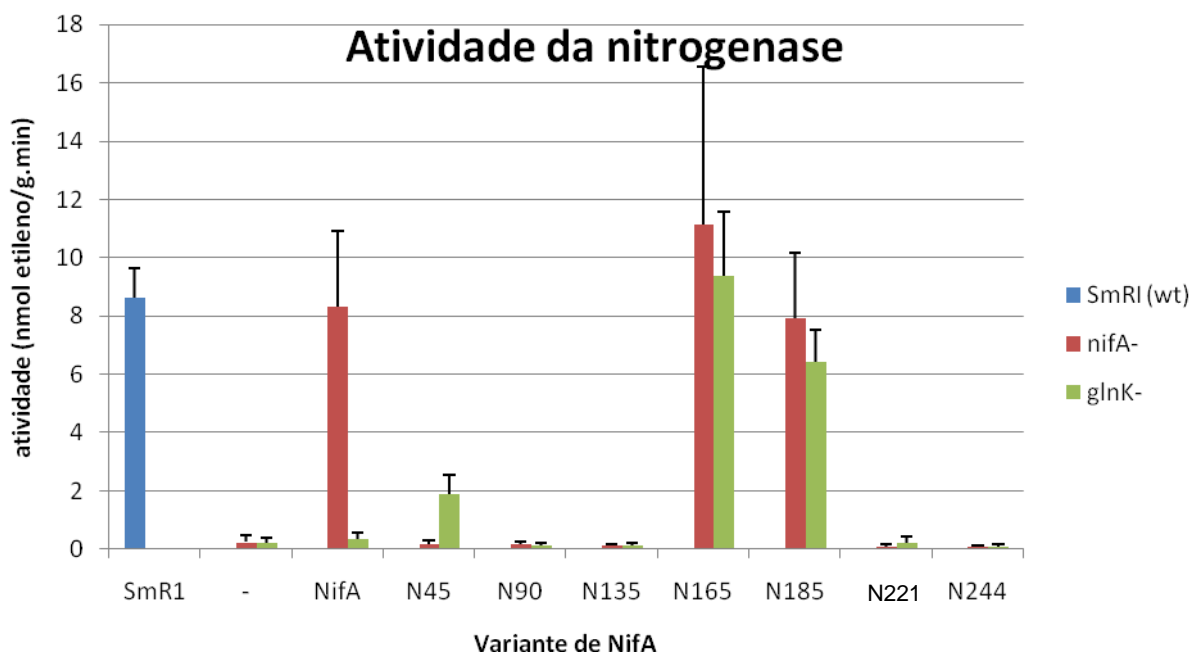


Figura 38 – atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* SmR54 (*nifA*⁻) e LN_{glnKdel} (*glnK*⁻) expressando variantes de *nifA* a partir do vetor pLAFR3.18(p*nifA*). O controle positivo SmR1 (em azul) é a estirpe selvagem de *H. seropedicae*. As linhas acima das barras correspondem ao desvio padrão.

Algumas considerações podem ser feitas a partir desses resultados. Primeiro, as variantes N165 e N185 são ativas em *H. seropedicae*, e não são dependentes de GlnK. Isso indica que nem os últimos 20 aminoácidos do domínio N-terminal nem o Q-linker estão implicados na interação proposta entre NifA e GlnK; seu comportamento é perfeitamente concordante com o da variante N203, testada anteriormente por Noindorf (2006).

Em segundo lugar, note-se que N221 e N244 não foram ativas em nenhuma circunstância. Esse resultado sugere que a região entre os aminoácidos 203 e 221 é essencial para a atividade de NifA, uma vez que a remoção desses resíduos ocasionou perda total da atividade. Isso não é inesperado, uma vez que os aminoácidos do domínio central (AAA+) são bastante conservados entre todas as proteínas da mesma família.

Um terceiro ponto a ser destacado é que as variantes N90 e N135 não foram ativas nas linhagens de *H. seropedicae* testadas. Assim, percebe-se que elas não se comportam exatamente da mesma forma que NifA selvagem (como previamente proposto a partir dos experimentos em *E. coli*). Dentro do modelo de regulação de NifA por interação entre os domínios, é possível que essas duas variantes sejam proteínas NifA permanentemente inibidas pela interação entre os domínios N-terminal e central, e que não possuem a região de interação com GlnK que é necessária para remover a inibição. Se isso for verdade, então algum motivo entre os aminoácidos 90 e 165 seria responsável pela interação interdomínios, ao passo que uma região entre os primeiros 90 aminoácidos seria responsável pela interação entre NifA e GlnK. Alternativamente, é possível que essas proteínas simplesmente não estejam corretamente estruturadas, ou não sejam capazes de formar oligômeros corretos para ativar a

transcrição. Essa última situação foi observada por Yoshimitsu et al. (2011) no ativador transcricional VnfA de *A. vinelandii*; a remoção de 15 resíduos de aminoácido N-terminais gera uma proteína trimérica inativa, em contraste com a forma nativa tetramérica.

O quarto ponto se refere à atividade de N45. É interessante notar que N45 é parcialmente ativa apenas no mutante *glnK*, mas não no mutante *nifA*. Considerando esse resultado, há duas possíveis situações que explicam essa atividade inesperada: é possível que ou a ausência de GlnK ou a presença de NifA nativa sejam necessárias para a atividade de N45.

Se a primeira proposição for verdadeira, então é permitido inferir que N45 está corretamente estruturada (caso contrário não se veria atividade alguma), mas sua ativação parece ser dependente da ausência de GlnK, o que é contra-intuitivo dentro do modelo atualmente proposto (ver Figura 5). Uma possível explicação para isso é que GlnK interage com N45 de maneira inibitória; a ausência de GlnK permitiria que N45 fosse ativa. Se isso for verdadeiro, então o modelo de regulação de NifA por GlnK deve incluir uma interação permanente entre as duas proteínas, na qual o estado de uridililação de GlnK e sua ligação a efetores seriam causadores dos eventos de ativação e inativação de NifA.

Ainda, isso implicaria na existência de dois controles inibitórios da atividade de NifA: a inibição pelo domínio N-terminal (que esse resultado nos obriga a creditar aos 45 primeiros aminoácidos) e a inibição por GlnK não-uridililada; implica também em um mesmo mecanismo sendo responsável por aliviar as duas inibições (a saber, a presença de GlnK-UMP₃ aliviaria a inibição do domínio N-terminal sobre o central e a inibição de NifA por GlnK), o que é uma proposta pouco parcimoniosa, que requer outros experimentos para talvez se mostrar válida. Um modelo para isso é mostrado abaixo:

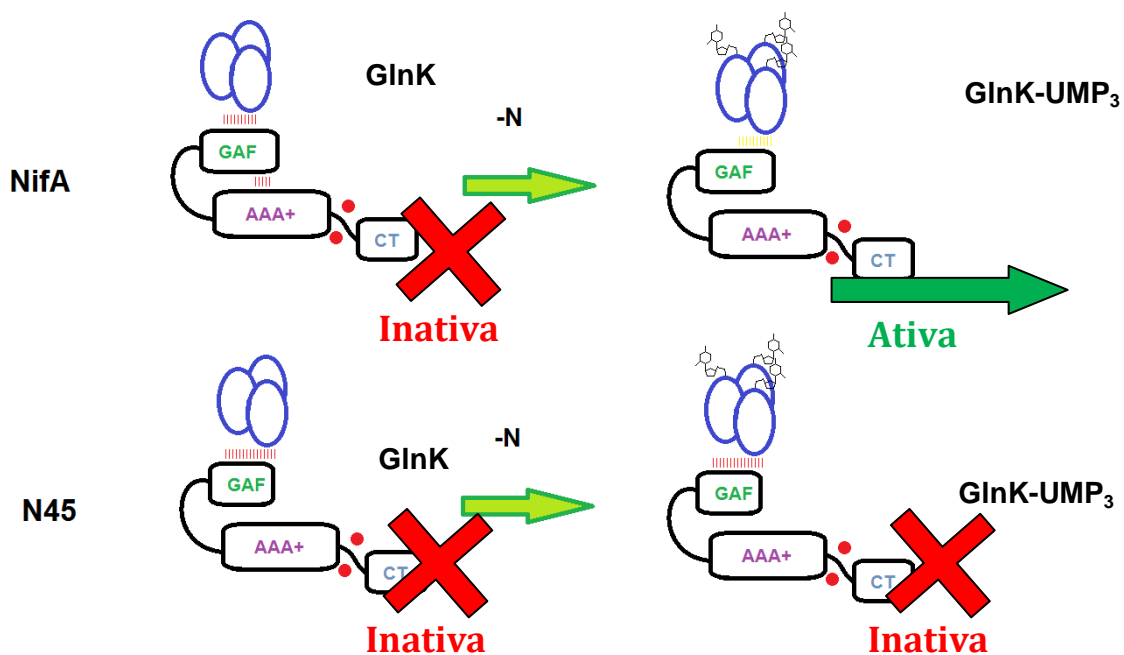


Figura 39 – modelo de regulação de NifA com duas interações inibitórias. De acordo com essa proposta, NifA é inibida por seu domínio N-terminal e por GlnK não-modificada. A uridililação de GlnK retira simultaneamente as duas inibições. Possivelmente, GlnK e GlnK-UMP interagem com NifA em regiões

parcialmente sobrepostas, mas diferentes, sendo que GlnK-UMP interage com algum(ns) dos 45 primeiros aminoácidos de NifA. N45, que não possui esses aminoácidos, só interage com GlnK e com GlnK-UMP de maneira inibitória.

A remoção dos 45 dos primeiros 45 aminoácidos remove o sítio de interação entre os domínios de NifA, mas não remove o sítio de interação com GlnK. A uridililação de GlnK não alivia a inibição por GlnK nesse mutante porque, possivelmente, os primeiros 45 aminoácidos também são importantes para a interação efetiva de NifA com GlnK-UMP, e possivelmente para a transdução do sinal de desinibição. Assim, N45 seria inibida tanto por GlnK quanto por GlnK-UMP.

Por outro lado, é possível que a diferença sentida por N45 nos genótipo *nifA*⁻ e *glnK* não seja a presença ou ausência de GlnK, mas sim de NifA. NifA é um ativador transcricional provavelmente oligomérico; é possível que N45 seja ativa em *glnK* por formar heterohexâmeros com outras moléculas de NifA, e de alguma forma isso torna o complexo parcialmente ativo. No mutante NifA, por outro lado, é possível que N45 não consiga formar homohexâmeros, e por isso não seja ativo. Embora se atribua a constituição de oligômeros ao domínio Central (vide estudos com PspF – RAPPAS et al., 2006), a modificação do domínio N-terminal pode ter tido alguma influência na estruturação dos demais domínios. Uma figura disso é mostrada abaixo:

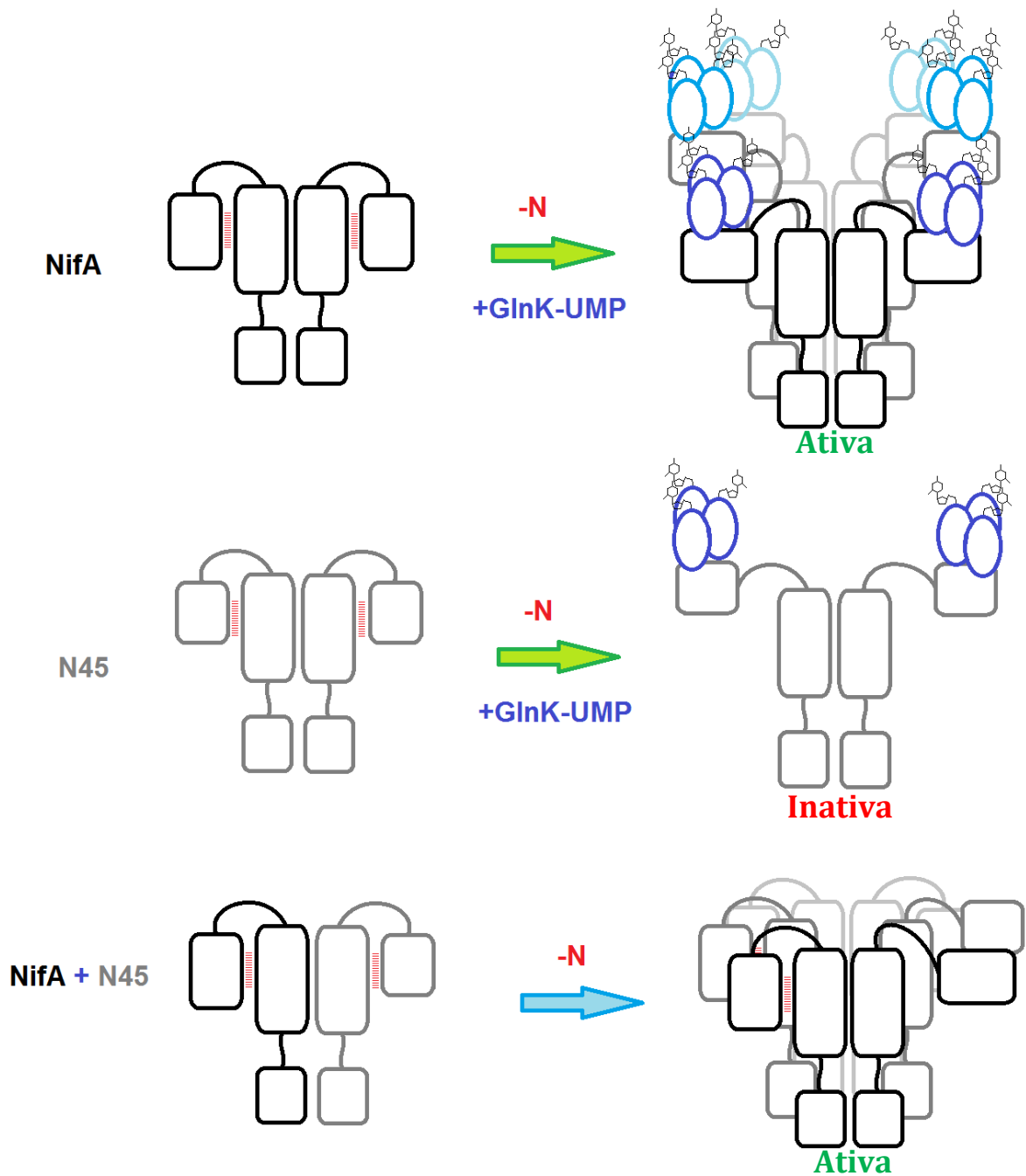


Figura 40 – Modelo de formação de heterooligômeros ativos de NifA e N45. (1) NifA é provavelmente dimérica quando inativa; a interação com GlnK-UMP permite que ela forme um oligômero ativo. (2) N45 não consegue formar um oligômero, mesmo se interagir com GlnK. (3) Um heterooligômero de NifA+N45 pode ser parcialmente ativo independentemente da interação com GlnK.

Nesse caso, não seria necessário modificar o modelo: N45 continuaria sendo permanentemente inibida, mas sua atividade em *H. seropedicae glnK* seria explicada pela formação de um heterooligômero que escapasse parcialmente do controle pelo domínio N-terminal.

Note-se, no entanto, a ocorrência de uma inconsistência entre os resultados obtidos com a expressão de N45 a partir dos promotores *lac* e *nifA*: a atividade de N45 é a mesma independentemente do promotor a sua montante, diferentemente do que se observa com NifA nativa (cuja atividade é quatro vezes maior quando expressa a partir do promotor *nifA*). Isso

parece favorecer a hipótese de que N45 é ativa devido à formação de heteroligômeros com NifA: a atividade de N45 seria essencialmente a mesma quando expressa a partir dos dois promotores porque a quantidade de NifA nativa disponível para a heteroligomerização é sempre a mesma no mutante *glnK*. Assim, o aumento da expressão de N45 só levaria ao acúmulo de N45 dimérica inativa, pois todos os heteroligômeros de N45 e NifA nativa já terão incorporado o máximo de N45 que podem abrigar.

5.4.2. Atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae nifA⁻*, *glnK*, e *nifA⁻ glnK*.

Os plasmídeos *ppnifANifA*, *ppnifAN45*, *ppnifAN90*, *ppnifAN135*, *ppnifAN165*, *ppnifAN185*, *ppnifAN203*, *ppnifAN218*, e *ppnifAN244* foram transformados em *E. coli* S17-1. Colônias resistentes a tetraciclina foram cultivadas em meio LB e utilizadas para a transferência dos plasmídeos por conjugação para *H. seropedicae* SmR1 *nifA⁻*, *glnK* e *nifA⁻ glnK*. Colônias transformantes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato HPN, e mantidas em meio NFb-malato HPN semi-sólido contendo estreptomicina, kanamicina e tetraciclina.

Para garantir que os resultados obtidos não seriam devidos à contaminação das culturas por outras espécies de bactérias, uma amostra de cada cultura foi usada para amplificação de DNA 16S de cada cultura. A figura 41 mostra um gel de agarose 1% contendo os produtos dessas amplificações.

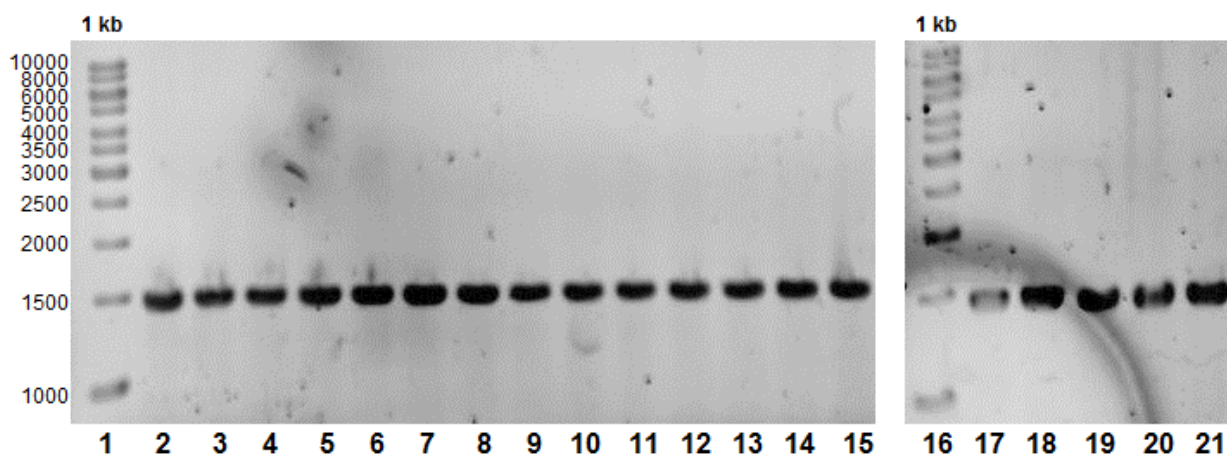


Figura 41 – amplificação do gene 16S de culturas de *H. seropedicae nifH::lacZ*, *nifA⁻ nifH::lacZ* (hospedando os plasmídeos *ppnifANifA*, *ppnifAN45*, *ppnifAN90*, *ppnifAN135*, *ppnifAN165*, *ppnifAN185*, *ppnifAN203*, *ppnifAN221*, e *ppnifAN244*), e *glnK nifH::lacZ* (hospedando os plasmídeos *ppnifANifA*, *ppnifAN45*, *ppnifAN90*, *ppnifAN135*, *ppnifAN165*, *ppnifAN185*, *ppnifAN203*, *ppnifAN221*, e *ppnifAN244*), usando os primers Y1 e Y3. Linhas (1) e (16), marcador de tamanho molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas).

A amostra de DNA 16S foi posteriormente digerida com a enzima *HaeIII*, e os sistemas de restrição foram então analisados em gel de agarose 2% (figura 42). A comparação do padrão de bandas gerado com o esperado pela seqüência dessa região obtida do genoma de *H. seropedicae* (PEDROSA et al., 2011) assegurou que não houve contaminação detectável dos inóculos.

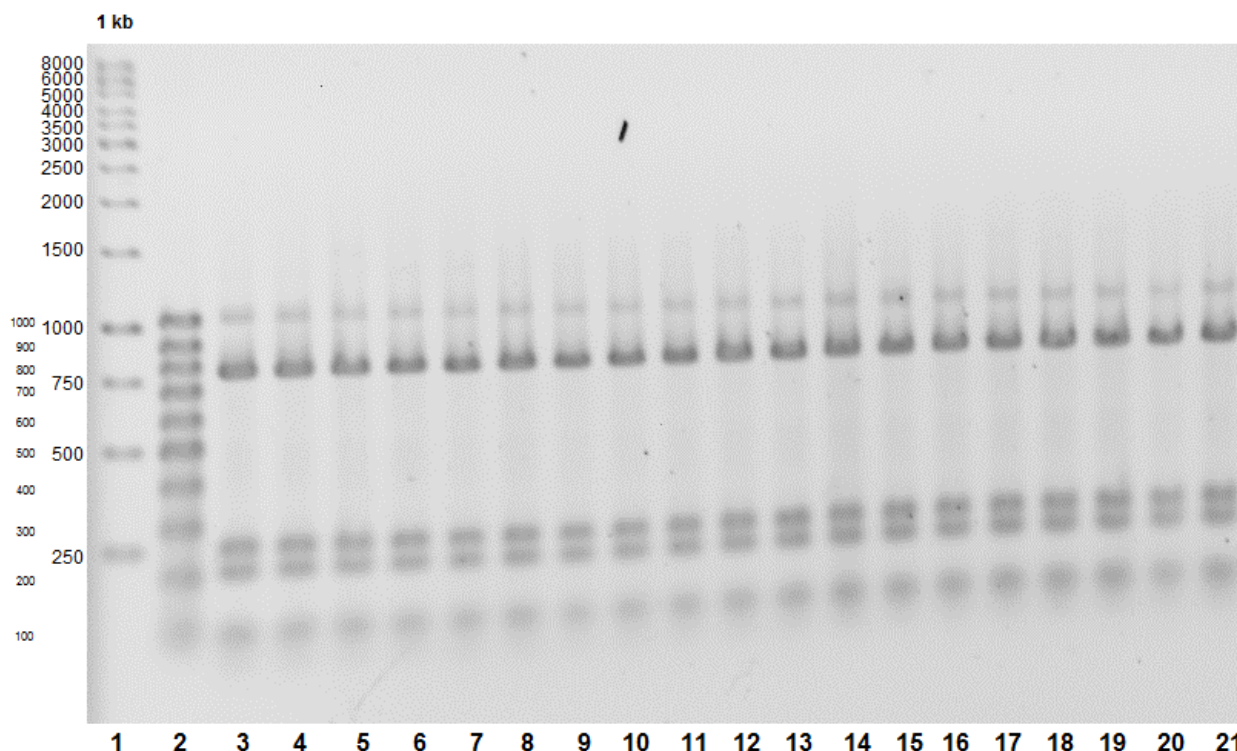


Figura 42 – restrição do gene 16S de culturas de *H. seropedicae nifH::lacZ*, *nifA⁻ nifH::lacZ* (hospedando os plasmídeos ppnifANifA, ppnifAN45, ppnifAN90, ppnifAN135, ppnifAN165, ppnifAN185, ppnifAN203, ppnifAN221, e ppnifAN244), e *glnK nifH::lacZ* (hospedando os plasmídeos ppnifANifA, ppnifAN45, ppnifAN90, ppnifAN135, ppnifAN165, ppnifAN185, ppnifAN203, ppnifAN221, e ppnifAN244) com a enzima HaeIII. Linhas (1) e (2), marcadores de tamanho molecular GeneRuler™ 1kb DNA ladder e 100 bp ladder (Fermentas), respectivamente.

5.4.2.1. Atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae nifA⁻*

O ensaio de β -galactosidase em *H. seropedicae* foi conduzido conforme descrito em Materiais e Métodos. No caso das culturas que passaram por troca gasosa, a concentração de oxigênio final foi ajustada para 1,5%. A concentração final de oxigênio foi estimada por cromatografia gasosa, e foi de em média $1,59\% \pm 0,27$. A figura 43 mostra os resultados obtidos com a expressão das variantes na estirpe *glnK nifH::lacZ* (cada valor representa a média de ao menos três experimentos independentes).

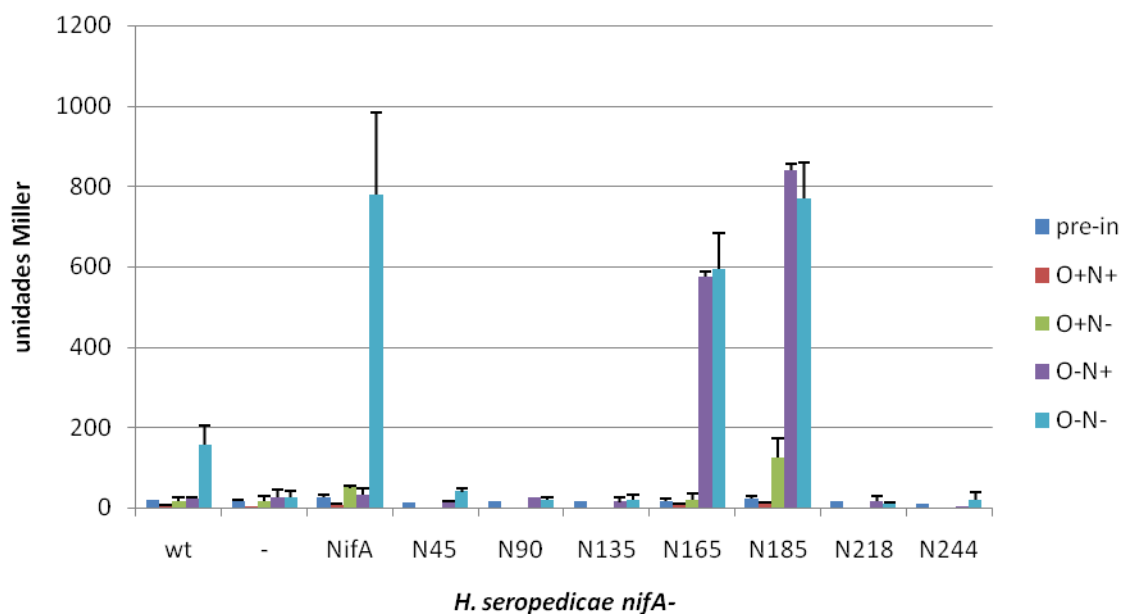


Figura 43 – atividade de β -galactosidase de variantes de NifA expressas a partir de pLAFR3.18(pnifA) em *H. seropedicae nifA⁻ nifH::lacZ*. As barras coloridas representam a atividade em 21% O₂ e 20 mM NH₄Cl (O+N+), 21% O₂ e 0 mM NH₄Cl (O+N-), ~1,5% O₂ e 20 mM NH₄Cl (O-N+), e ~1,5% O₂ e 0 mM NH₄Cl (O-N-). As linhas acima das barras correspondem ao desvio padrão.

Esses resultados mostram que N165 e N185 se comportam em *H. seropedicae* da mesma maneira que se comportam em *E. coli*: ambas são ativas somente em baixas concentrações de oxigênio e não são reguladas por amônio. A alta atividade de β -galactosidase gerada pela expressão de NifAs a partir do vetor pLAFR3.18(pnifA) em comparação com a estirpe selvagem pode ser explicada pelo número de cópias de pLAFR3.18, que, apesar de baixo, é maior que o número de cópias do genoma. As demais variantes também tiveram comportamentos iguais aos anteriormente observados.

5.4.2.2. Atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae glnK*

Os resultados obtidos com a expressão das variantes de NifA em *H. seropedicae glnK nifH::lacZ* estão mostrados na figura 44:

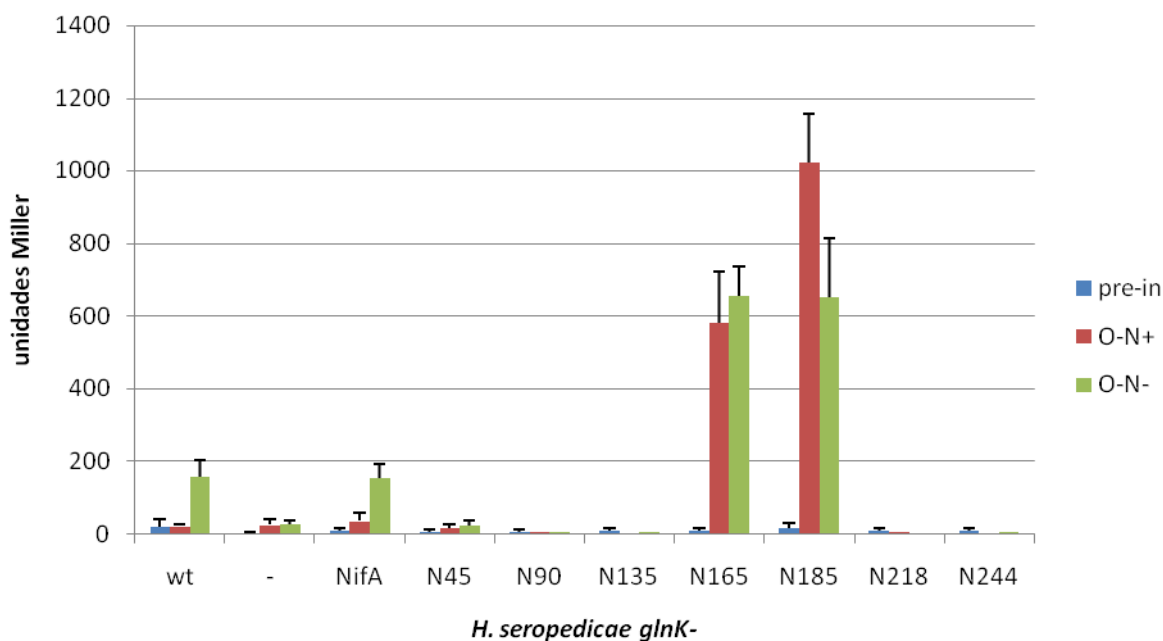


Figura 44 – atividade de β -galactosidase de variantes de NifA expressas a partir de pLAFR3.18(pnifA) em *H. seropedicae glnK nifH::lacZ*. As barras coloridas representam a atividade em $\sim 1,5\%$ O_2 e 20 mM NH_4Cl (O-N+) e $\sim 1,5\%$ O_2 e 0 mM NH_4Cl (O-N-). As linhas acima das barras correspondem ao desvio padrão.

Novamente, aqui se confirma o padrão de atividade de N165 e N185. No entanto, há outros pontos a notar:

NifA foi parcialmente ativa no mutante *glnK*, o que é inesperado. Mas essa atividade pode ser um indicativo de que a interação entre os domínios de NifA não é perfeita, e há momentos em que a inibição deixa de ocorrer espontaneamente, mesmo que por um período breve. Isso não seria detectável no ensaio de atividade da nitrogenase porque não haveria produção de grandes quantidades de nitrogenase, e o pouco que fosse produzido seria rapidamente degradado pela célula (pois a nitrogenase tem meia-vida curta em condições desfavoráveis, especialmente devido à sensibilidade a oxigênio – EADY et al., 1978). A enzima β -galactosidase, por outro lado, é muito mais estável, e poderia se acumular a partir desse escape de expressão a ponto de ter sua atividade detectada.

N45 não promoveu atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae glnK nifH::lacZ*. É preciso admitir então que a incoerência entre os resultados de complementação de fenótipo mutante e de medição de β -galactosidase resultam da pouca confiabilidade de algum dos métodos (ou ao menos da execução desses métodos). As implicações do resultado positivo de atividade da nitrogenase já foram discutidas; no entanto, se considerarmos esse resultado como um artefato, e nos ativermos ao resultado negativo da atividade de β -galactosidase no mutante *glnK* de *H. seropedicae*, então se pode considerar N45 como intrinsecamente inativa/desestruturada, tal qual N90 e N135. Isso sendo verdade, o modelo de regulação de NifA por GlnK pode permanecer inalterado. Isso posto, na melhor das hipóteses (que é de N45, N90, e N135 serem funcionais porém permanentemente inibidas), a região de interação entre

NifA e GlnK poderia estar localizada nos primeiros 45 aminoácidos de NifA (o que está coerente com achados em *A. brasilense* (ARSÈNE et al., 1999), e a região de interação com o domínio central estaria entre os aminoácidos 135 e 165. A figura 45 ilustra a situação:

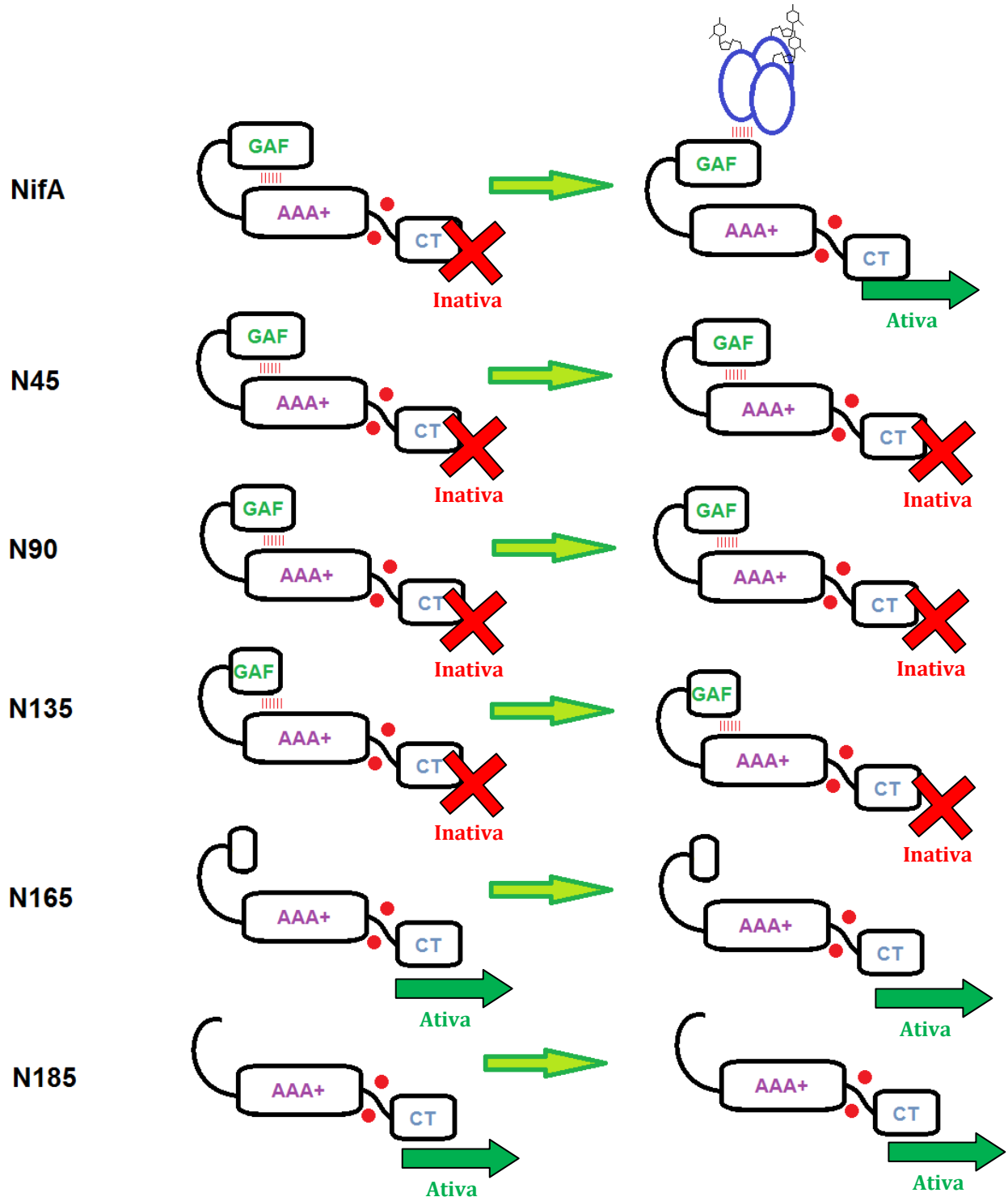


Figura 45 – modelo de regulação de NifA por interação entre GlnK e o domínio N-terminal. GlnK interagiria com uma região entre os 45 primeiros aminoácidos de NifA, removendo a inibição sobre o domínio central. A inibição seria exercida pela interação entre o domínio N-terminal e um motivo presente entre os aminoácidos 135 e 165 do domínio N-terminal.

A idéia de que haveria uma região de interação interdomínios entre os aminoácidos 135 e 165 é interessante, pois se observa que nessa região há nucleotídeos conservados em

circunstância. Se, por exemplo, N135 for simplesmente uma proteína disfuncional, não se poderá atribuir a inibição de NifA à região entre os aminoácidos 135 e 165; e se N45, N90, e N135 também o forem, então não se pode dizer com certeza que a região entre os primeiros 45 aminoácidos está envolvida na interação entre NifA e GlnK.

Essas considerações, no entanto, são especulativas; é preciso suporte experimental para poder escolher entre os modelos propostos.

6. CONCLUSÕES

As medições de atividade das 11 novas variantes de NifA construídas permitem afirmar que:

- 6.1. As variantes N165 e N185 são ativas em *E. coli* e em *H. seropedicae*, e não sofrem regulação por amônio, tal qual a proteína NifA N-truncada N203.
 - 6.1.1. Por consequência, a região entre os aminoácidos 165 e 203, correspondentes ao final do domínio N-terminal e ao Q-linker, aparentemente não estão envolvidas na regulação de NifA pelos níveis de amônio.
- 6.2. As variantes N221 e N244 não foram ativas em *E. coli* ou *H. seropedicae* sob nenhuma condição testada. Como elas se distinguem de N203 apenas pela ausência de regiões do domínio Central (que não estão envolvidas com nenhum tipo de regulação), sugere-se que são proteínas completamente inativas. Assim, a região entre os aminoácidos 203 e 221 é essencial para a atividade de NifA.
- 6.3. As variantes N90 e N135 não foram ativas em nenhuma condição testada; mas, como suas truncagens ocorrem em uma região regulatória, há três possíveis explicações:
 - 6.3.1. Essas proteínas são completamente inativas (seja por estruturação incorreta ou dificuldade de oligomerização).
 - 6.3.2. Essas proteínas são permanentemente inibidas por seu domínio N-terminal. Nesse caso, a região de interação entre os domínios N-terminal e Central estaria localizada anteriormente ao aminoácido 165.
 - 6.3.3. Essas proteínas interagem com GlnK de maneira inibitória.
- 6.4. A variante N45 foi ativa apenas em *H. seropedicae glnK*; isso sugere a possibilidade de essa proteína interagir com GlnK de maneira inibitória (ver discussão anterior).
- 6.5. As variantes de NifA com redução do Q-linker não foram ativas em *E. coli*. Isso indica que essas proteínas ou se comportam como NifA selvagem, ou são permanentemente inativas, ou completamente disfuncionais.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.
- ARAVIND, L.; PONTING, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 458-459, 1997.
- ARAÚJO, A. E. da S.; ROSSETTO, C. A. V.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência agrotecnológica**, v. 34, n. 4, p. 932-939, 2010.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 80-105, 2001.
- ARSÈNE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4830-8, 1996.
- ARSÈNE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P II : effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 339-343, out 1999.
- ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible Uridylylation of the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Regulates Its Ability to Stimulate the Dephosphorylation of the Transcription Factor Nitrogen Regulator I (NRI or NtrC). **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 45, p. 28288-28293, 1994.
- ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 431-447, 1998.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov., a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Biology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, p. 37-40, 1987.
- BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.
- BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.; PEDROSA, F. O. Evidence for Two Possible *glnB*-Type Genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 14, p. 4623-4626, 1997.
- BERGER, D. K.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. The isolated catalytic domain of NIFA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription in vitro: activation is inhibited by NIFL. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 1, p. 103-7, 1994.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S. *et al.* Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1-2, p. 195-209, 1995.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 241-250, 1995.

BONATTO, A. C. **Caracterização in vitro da modificação pós-traducional das proteínas GlnB e GlnK de *Herbaspirillum seropedicae***. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII -regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 12, p. 2949-53, 1971.

BRUHN, C.; LENKE, H.; KNACKMUSS, H. J. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 1, p. 208-10, 1987.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9339-9342, 1991.

CANNON, F. C.; DIXON, R A; POSTGATE, J R; PRIMROSE, S. B. Chromosomal integration of *Klebsiella* nitrogen fixation genes in *Escherichia coli*. **Journal of general microbiology**, v. 80, n. 1, p. 227-39, 1974.

CARRO, L.; RIVAS, R.; LEÓN-BARRIOS, M. *et al.* *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., three new species isolated in Tenerife (Canary Islands). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2011.

CHEN, B.; SYSOEVA, T. A.; CHOWDHURY, S.; NIXON, B. T. Regulation and action of the bacterial enhancer-binding protein AAA+ domains. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 1, p. 89-93, 2008.

CHEN, S.; DU, J.; WU, L.; ZHAO, Y.; LI, J. Interaction between PII and NifA in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 170-174, 2003.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, CLAUDINE; LI, J.-L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr-->Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 273, n. 5, p. 415-22, 2005.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; *et al.* Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, 2011.

CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 7, p. 2172-5, 1989.

COMMICHAU, F. M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 2, p. 167-72, 2006.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 4, p. 536-545, 2002.

CREWS, T.; PEOPLES, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 102, n. 3, p. 279-297, 2004.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; *et al.* 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

DIVAN BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 485-491, 2000.

DIXON, R. KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-31, 2004.

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil biology and biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 771-774, 1997.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.

DREPPER, T. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2203-2212, 2003.

DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO Journal**, v. 5, n. 2, p. 441-447, 1986.

EADY, R. R.; ISSACK, R.; KENNEDY, C.; POSTGATE, J. R.; RATCLIFFE, H. D. Nitrogenase Synthesis in *Klebsiella pneumoniae*: Comparison of Ammonium and Oxygen Regulation. **Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 277-285, 1978.

el-KOMY, H. M. A.; SAAD, O. A. O.; HETTA, A. M. A. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using ¹⁵N-dilution method. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 6, p. 787-793, 2003.

ERZBERGER, J. P.; BERGER, J. M. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 35, p. 93-114, 2006.

FIEDLER, U.; WEISS, V. A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. **The EMBO journal**, v. 14, n. 15, p. 3696-705, 1995.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 352-86, 1994.

FU, H.; BURRIS, R. H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 3168-75, 1989.

GILLER, K. E.; CADISCH, G. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1-2, p. 255-277, 1995.

GLÖER, J.; THUMMER, R.; ULLRICH, H.; SCHMITZ, R. A. Towards understanding the nitrogen signal transduction for nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **The FEBS journal**, v. 275, n. 24, p. 6281-94, 2008.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A; KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 24, p. 6661-7, 1998.

HEESWIJK, W. C.; WEN, D.; CLANCY, P. *et al.* The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers in vivo: fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 3942-7, 2000.

HELLING, R. B. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4571-5, 1998.

HO, Y. S.; BURDEN, L. M.; HURLEY, J. H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **The EMBO journal**, v. 19, n. 20, p. 5288-99, 2000.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2965-2982, 1996.

HUERGO, LUCIANO FERNANDES. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2006.

HURLEY, JAMES H. GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2003, n. 164, p. PE1, 2003.

IISMAA, S. E.; WATSON, J. M. The nifA gene product from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* lacks the N-terminal domain found in other NifA proteins. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 943-955, 1989.

JAGGI, R.; HEESWIJK, W. C. VAN; WESTERHOFF, H. V.; OLLIS, D. L.; VASUDEVAN, S. G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **The EMBO journal**, v. 16, n. 18, p. 5562-71, 1997.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. *et al.* Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8530-8, 2004.

JOVANOVIĆ, G.; WEINER, L.; MODEL, P. Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1936-1945, 1996.

JUNG, S.-Y.; LEE, M.-H.; OH, T.-K.; YOON, J.-H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. Pt 10, p. 2284-8, 2007.

KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 895-899, 1983.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389-397, 1994.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 887-891, 1997.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of sigma 54 (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 3, p. 367-76, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 349-77, 2007.

LIU, Y.; KAHN, M. L. ADP-ribosylation of *Rhizobium meliloti* glutamine synthetase III in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 4, p. 1624-1638, 1995.

MA, Y.; LUDDEN, PAUL W. Role of the dinitrogenase reductase arginine 101 residue in dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase binding, NAD binding, and cleavage. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 250-6, 2001.

MACHADO, I. M.; YATES, M G; MACHADO, H. B.; SOUZA, E M; PEDROSA, F O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 29, n. 12, p. 1599-602, 1996.

MACNEIL, D. General method , using Mu-MudI dilyso gens, to determine the direction of transcription of and generate deletions in the *glnA* region of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 146, n. 1, p. 260-268, 1981.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 601-610, 2004.

MASEPOHL, BERND; KLIPP, WERNER; PÜHLER, ALFRED. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 212, n. 1, p. 27-37, 1988.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 604-22, 1995.

MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics**. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; *et al.* Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS letters**, v. 447, n. 2-3, p. 283-6, mar 1999.

MONTEIRO, R A; SOUZA, E M; YATES, M G; PEDROSA, F O; CHUBATSU, L S. *In-trans* regulation of the N-truncated-NIFA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS microbiology letters**, v. 180, n. 2, p. 157-61, 1999.

MONTEIRO, R. A.. **Análise funcional dos domínios modulares da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2001.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157-164, 1999.

NOINDORF, L. **Identificação e caracterização do operon orf1glnKamtB e do gene amtH de *Herbaspirillum seropedicae***. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2006.

NOINDORF, L.; BONATTO, ANA C; MONTEIRO, ROSE A; *et al.* Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 8, 2011.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, M. A. S. **Estudo da regulação da atividade da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* em resposta aos níveis de amônio e oxigênio**. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2010.

OLIVEIRA, M. A. S.; BAURA, V. A.; AQUINO, B. *et al.* Role of conserved cysteine residues in *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Research in microbiology**, v. 160, n. 6, p. 389-95, 2009.

PASCHEN, A.; DREPPER, T; MASEPOHL, B; KLIPP, W. *Rhodobacter capsulatus* nifA mutants mediating nif gene expression in the presence of ammonium. **FEMS microbiology letters**, v. 200, n. 2, p. 207-13, 2001.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.-U.; KLIPP, WERNER; *et al.* Yeast Two-Hybrid Studies on Interaction of Proteins Involved in Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 17, p. 5240-5247, 2003.

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; *et al.* Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 189-95, 4 out 2001.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS genetics**, v. 7, n. 5, p. e1002064, 2011.

PEDROSA, F. O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. M. P. *et al.* Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil biology and biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 843-846, 1997.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, n. 1, p. 95-101, 1984.

PORTER, S. C.; NORTH, A. K.; WEDEL, A. B.; KUSTU, S. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. **Genes & Development**, v. 7, n. 11, p. 2258-2273, 1993.

PÉREZ-MARTÍN, J.; LORENZO, V. The amino-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9392-6, 1995.

RAPPAS, M.; SCHUMACHER, J.; NIWA, H.; BUCK, MARTIN; ZHANG, X. Structural basis of the nucleotide driven conformational changes in the AAA+ domain of transcription activator PspF. **Journal of molecular biology**, v. 357, n. 2, p. 481-92, 2006.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-54, 2004.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 829-836, 2001.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, FABIO O; *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS microbiology ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I. *et al.* *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. Pt 6, p. 1341-8, 2006.

RUDNICK, P.; KUNZ, C.; GUNATILAKA, M. K.; HINES, E. R.; KENNEDY, CHRISTINA. Role of GlnK in NifL-Mediated Regulation of NifA Activity in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 812-820, 2002.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J. *et al.* Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 16, n. 10, p. 944-5, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. T.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; BURLINGAME, A. L.; KOSHLAND JR, D. E. Phosphorylation Site of NtrC , a Protein Phosphatase Whose Covalent Intermediate Activates Transcription. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 15, p. 5117-5122, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHMID, M.; BALDANI, J. I. V. O.; HARTMANN, A. The Genus *Herbaspirillum*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Eds.). **The Prokaryotes**. Springer, 2004, v. 5, p. 141-150, 2006.

SCHWAB, S. **Identificação e análise de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio**. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica Universidade Federal do Paraná, 2006.

SHAH, V. K.; BRILL, W. J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3249-3253, 1977.

SHINGLER, V. Signal sensing by 54⁻dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 409-416, 1996.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Nature biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983.

SIMPSON, F.; BURRIS, R. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, n. 4653, p. 1095-1097, 1984.

SIMS, A. P.; FOLKES, B. F. A Kinetic Study of the Assimilation of [¹⁵N]-ammonia and the Synthesis of Amino Acids in an Exponentially Growing Culture of *Candida utilis*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 159, n. 976, p. 479-502, 1964.

TABOR, S.; RICHARDSON, C. C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. February, p. 1074-1078, 1985.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TULI, R.; MERRICK, M. J. Over-production and characterization of the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae* - the transcriptional activator of *nif* gene expression. **Journal of general microbiology**, v. 134, n. 2, p. 425-32, 1988.

VITOUSEK, P. M.; ABER, J. D.; HOWARTH, R. W. *et al.* Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological applications**, v. 7, n. 3, p. 737-750, 1997.

WASSEM, R.; SOUZA, E M DE; YATES, M G; PEDROSA, F. D.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Molecular microbiology**, v. 35, n. 4, p. 756-64, 2000.

WASSEM, ROSELI. **Regulação da transcrição do gene *nifA* de *Herbaspirillum seropedicae* pelas proteínas NtrC, NifA e IHF**. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2000.

WEBER, O B; BALDANI, V L D; TEIXEIRA, K. R. S. *et al.* Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, n. 1, p. 103-113, 1999.

WOEHLE, D. L.; LUEDDECKE, B. A.; LUDDEN, P. W. ATP-dependent and NAD-dependent modification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum* in vitro. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 23, p. 13741-9, 1990.

WOOTTON, J. C.; DRUMMOND, M. H. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 2, n. 7, p. 535-543, 1989.

YOSHIMITSU, K.; TAKATANI, N.; MIURA, Y.; WATANABE, Y.; NAKAJIMA, H. The role of the GAF and central domains of the transcriptional activator VnfA in *Azotobacter vinelandii*. **The FEBS journal**, v. 278, n. 18, p. 3287-97, 2011.

YOUNG, J. P.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271-7, 1991.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

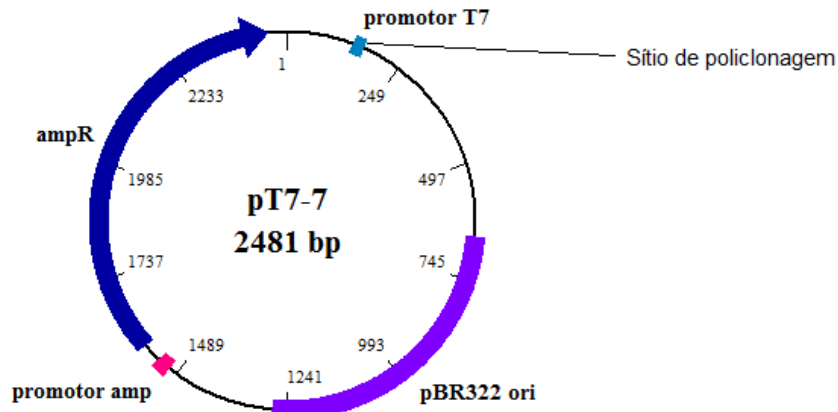
ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2782-7, 2004.

ZIMMER, D. P.; SOUPENE, E.; LEE, H. L. *et al.* Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14674-9, 2000.

ZOU, X.; ZHU, Y.; POHLMANN, E. L. *et al.* Identification and functional characterization of NifA variants that are independent of GlnB activation in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 9, p. 2689-99, 2008.

ANEXOS

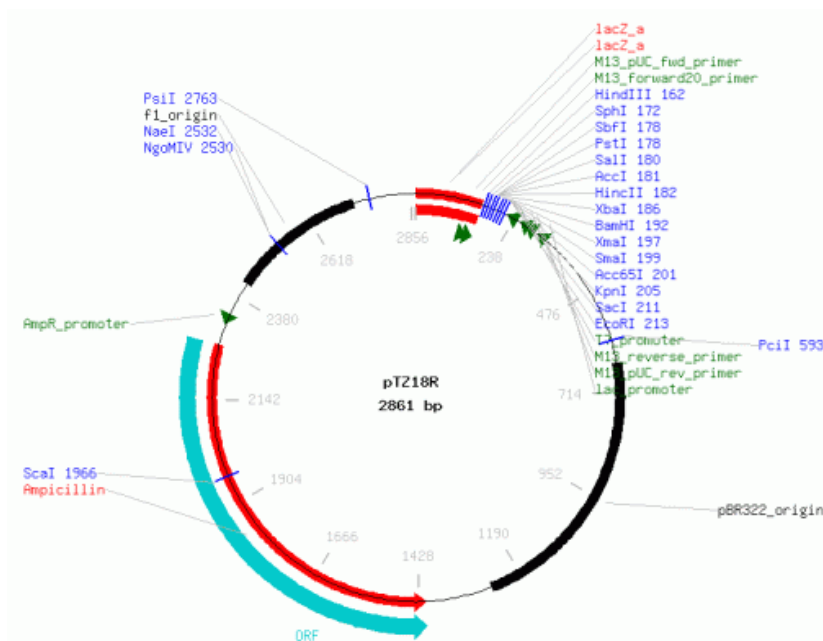
ANEXO 1 – Vetor pT7-7



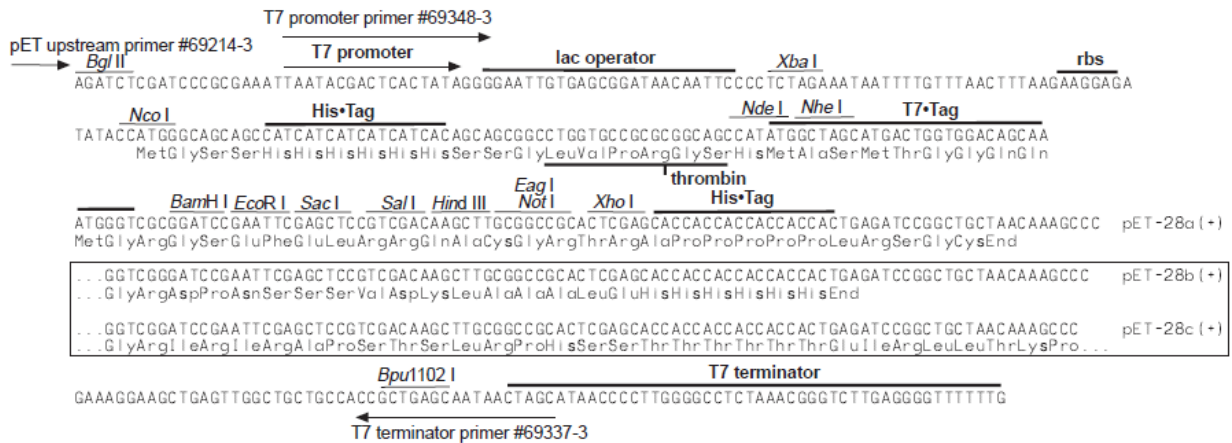
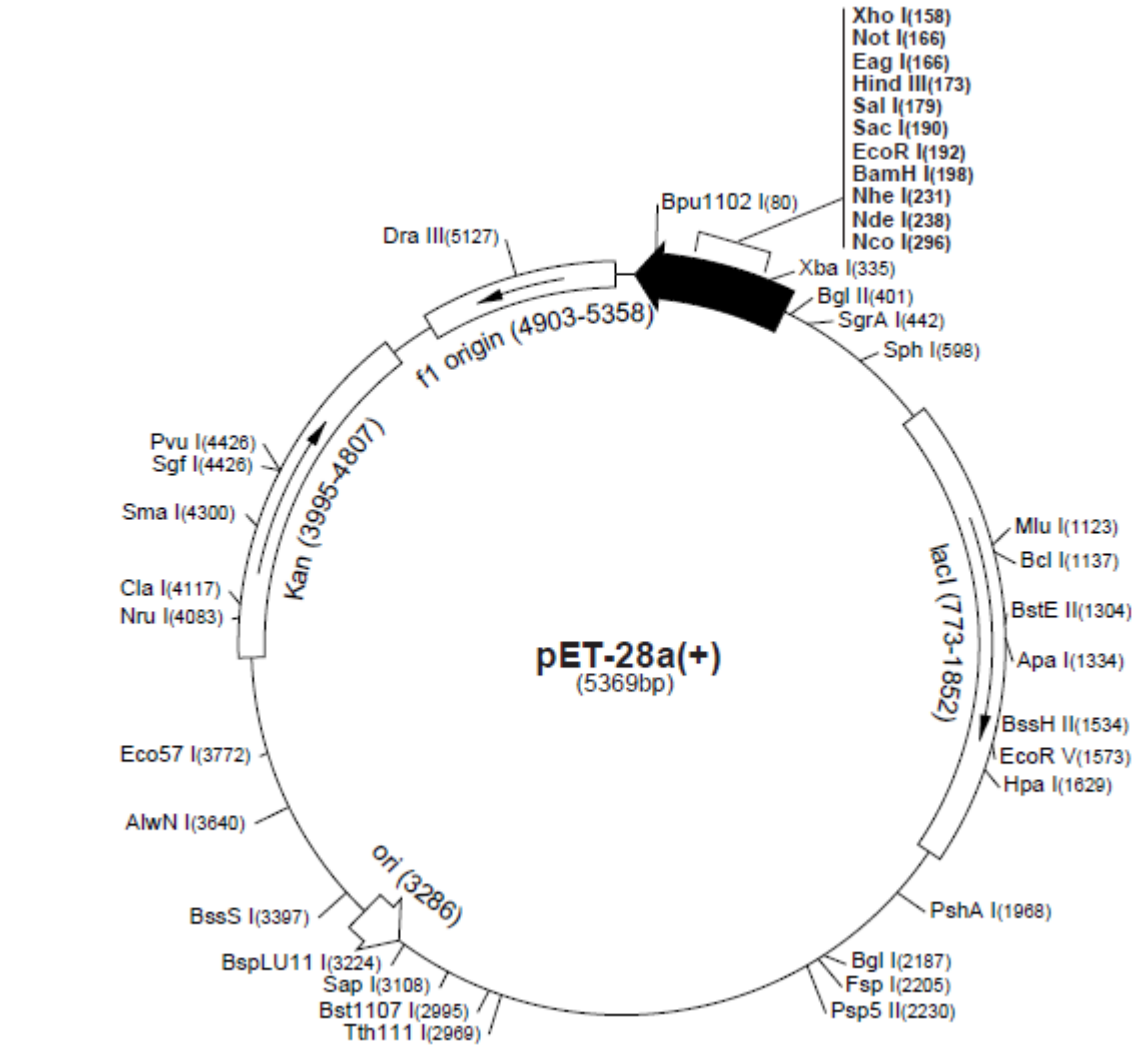
SmaI
XbaI
 CGATTCGAACTTCTCGATTTCGAACTTCTGATAGACTTCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCACAACGGTTTCCCTCTAGA
 T7 prom.

NdeI
EcoRI
BamHI
XbaI
Sall
PstI
HindIII
 AATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGAATTCGCGCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGCCCAAGCTTATC
 RBS

ANEXO 2 – vetor pTZ18R

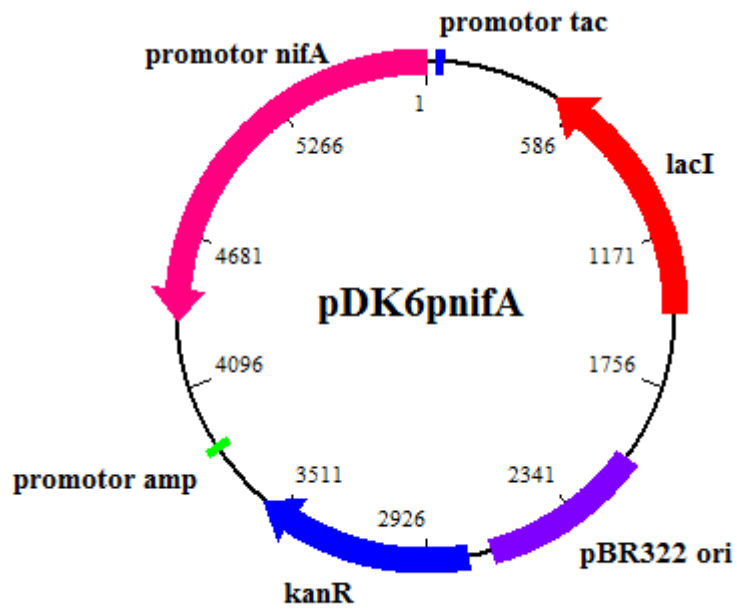


ANEXO 3 – Vektor pET28a



pET-28a-c(+) cloning/expression region

ANEXO 4 – vetor pDK6pnifA



ANEXO 5 – vetor pLAFR3.18

