

ANA CLAUDIA BONATTO

**CLONAGEM, SUPEREXPRESSION E PURIFICAÇÃO
DE UMA PROTEÍNA MUTANTE DE
*Herbaspirillum seropedicae***

Monografia apresentada para
obtenção do título de Bacharel no
Curso de Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadores: Emanuel Maltempi de
Souza e Elaine Machado Benelli.

CURITIBA

2000

***Aos meus pais Cláudio e Alvaneve
e a minha irmã Juliana,
que são os alicerces da minha vida.***

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Emanuel Maltempo de Souza e Elaine Machado Benelli pelos ensinamentos e dedicação que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de ingressar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio, onde este trabalho foi desenvolvido.

Às professoras Leda Satie Chubatsu, Berenice Reynaud Steffens e Liu Un Rigo pelo empenho e dedicação que dão sustentação ao grupo de fixação de nitrogênio.

Aos colegas da sala 275: Adriana, Fabiane, Fernando e Cynthia, pela amizade e colaboração diária em todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas Humberto, Juliana Ramos, Juliana Inaba, Leonardo e Rose Adele que estão sempre prontos a colaborar.

Aos amigos Valter, Roseli Prado e Dona Julieta pela amizade e ajuda inestimável.

Aos demais colegas do grupo de fixação de nitrogênio que de alguma forma me apoiaram no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas Helen, Fabíola e Simone pelo apoio, compreensão e carinho nas horas mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fixação Biológica de Nitrogênio.....	1
1.2. Regulação da Fixação de Nitrogênio.....	2
1.3. O envolvimento da proteína PII no sistema NTR.....	3
1.4. O envolvimento das proteínas PII e GlnK no controle da atividade de NifA.....	7
1.5. Objetivos.....	11
2. METODOLOGIA.....	12
2.1. Estirpes e plasmídeos.....	12
2.2. Condições de cultivo e antibióticos.....	12
2.3. Manipulação gênica.....	12
2.4. Clonagem dos genes <i>glnB</i> mutagenizados em vetor de expressão.....	12
2.5. Expressão das proteínas PII mutantes.....	13
2.6. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes.....	14
2.6.1. Eletroforese nas condições descritas por LAEMMLI (1970).....	14
2.6.2. Eletroforese sob condições desnaturantes para proteínas de baixo peso molecular.....	15
2.7. Sequenciamento.....	16
2.8. Dosagem de proteínas.....	16

2.9. Purificação da proteína PII-AA.....	17
2.9.1. Indução da expressão da proteína PII-AA em larga escala.....	17
2.9.2. Purificação da proteína PII-AA por cromatografia.....	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1. Clonagem dos genes <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> mutagenizados em vetor de expressão.....	20
3.2. Expressão das proteínas PII mutantes pelos plasmídeos pACB3 e pACB51.....	21
3.3. Sequenciamento dos genes <i>glnB</i> mutantes.....	22
3.4. Purificação da proteína mutante PII-AA.....	23
4. CONCLUSÕES.....	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DE CLONAGEM DO PLASMÍDEO pACB3.....	26
FIGURA 2: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PLASMÍDEO pACB3.....	27
FIGURA 3: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PLASMÍDEO pACB51.....	28
FIGURA 4: INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PII-AA E PII-AL EM <i>E. coli</i> (RB9065 λ DE3).....	29
FIGURA 5: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS PII E PII-AA DE <i>H. seropedicae</i>	30
FIGURA 6: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS PII E PII-AL DE <i>H. seropedicae</i>	31
FIGURA 7: INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PII-AA POR LACTOSE EM <i>E. coli</i> (RB9065 λ DE3).....	32
FIGURA 8: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA PROTEÍNA MUTANTE PII-AA APÓS PURIFICAÇÃO NA COLUNA DEAE SEPHAROSE.....	33
FIGURA 9: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA PROTEÍNA MUTANTE PII-AA APÓS PURIFICAÇÃO NA COLUNA AGAROSE-HEPARINA..	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ESTIRPES E PLASMÍDEOS.....	19
TABELA 2: TABELA DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PII-AA.....	35

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é um diazotrofo endofítico que foi inicialmente isolado de gramíneas. Neste organismo, a fixação de nitrogênio é regulada positivamente pela proteína NifA. A proteína PII, produto do gene *glnB*, possui um papel central nesta regulação. Dados de difração de raios-X mostraram que a proteína PII de *H. seropedicae* apresenta um motivo estrutural em hélice 3_{10} a partir do resíduo Gly 108, na região C-terminal, que está ausente na proteína PII de *E. coli*, porém presente na proteína GlnK (paróloga à PII). De fato, a proteína PII de *H. seropedicae* parece ser funcionalmente semelhante a proteína GlnK de *E. coli*. Enquanto a proteína GlnK de *E. coli* controla indiretamente a atividade de NifA, aliviando a inibição de NifL sobre NifA em condições de desrepressão, a PII de *H. seropedicae* parece controlar diretamente a atividade de NifA. Estes dados sugerem que a região C-terminal da proteína PII de *H. seropedicae* pode estar envolvida no controle da atividade de NifA. Para avaliar a importância funcional da região C-terminal da proteína PII de *H. seropedicae* foram construídos dois mutantes do gene *glnB*. Em um dos mutantes, obtido por mutagênese sítio dirigida, os resíduos Gly108 e Pro109 foram substituídos por resíduos de alanina e esta proteína foi denominada PII-AA. O outro gene mutante, obtido por mutagênese aleatória, apresenta quatro substituições de resíduos: Gln3-Arg; Thr5-Ala; Gly87-Cys; Gly108-Trp e codifica para a proteína PII-AL. Os genes *glnB* mutantes foram clonados no vetor de expressão pET28b+, originando os plasmídeos pACB3 e pACB51, respectivamente. O sequenciamento destes genes mostrou que o mutante aleatório apresenta a deleção de um nucleotídeo que torna o gene não funcional. A proteína PII-AA foi superexpressa a partir do plasmídeo pACB3 e purificada por cromatografia de troca iônica e de afinidade.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual o N_2 atmosférico é reduzido a íons amônio *in vivo*. Este processo ocorre em vários gêneros de eubactérias e arqueobactérias (POSTGATE, 1982; YOUNG, 1992). Estes microrganismos são chamados de bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotrofos) e podem ser classificados em três tipos: simbióticos, associativos ou de vida livre. A possibilidade destes organismos serem utilizados como biofertilizantes em substituição a fertilizantes nitrogenados, despertou um grande interesse econômico por apresentarem um baixo custo, além de serem seguros ao ambiente.

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica que foi isolada inicialmente da rizosfera de gramíneas e posteriormente de raízes de milho, sorgo e arroz e de caules e folhas de diferentes culturas de cana-de-açúcar, bananeira e abacaxizeiro (PIMENTEL *et al.*, 1991; BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; WEBER *et al.*, 1999), sugerindo que trata-se de um microrganismo endofítico (DÖBEREINER, 1992).

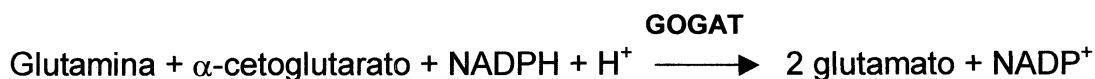
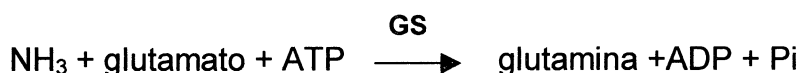
O estudo dos mecanismos de regulação e controle da fixação de nitrogênio nos diazotrofos pode contribuir para a engenharia de novas estirpes que fixem mais nitrogênio para as plantas, aumentando a eficiência do processo.

1.2. Regulação da fixação de nitrogênio

Nas bactérias diazotróficas a redução do dinitrogênio a amônio é catalizada pelo complexo enzimático da nitrogenase. Esta conversão requer um mínimo de 16 mols de ATP para reduzir 1 mol de N₂ a 2 mols de amônio, o que representa um alto custo energético (POSTGATE, 1982):



A amônia produzida é imediatamente assimilada via glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (NAGATAMI *et al.*, 1971; POSTGATE, 1982):



O complexo enzimático da nitrogenase é formado por duas metaloproteínas: a proteína-MoFe (dinitrogenase) e a proteína-Fe (dinitrogenase redutase) (DEAN *et al.*, 1993). A proteína MoFe é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, que perde atividade rapidamente em contato com o ar (EADY, 1986). As sequências de aminoácidos das subunidades α e β são codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente. A proteína Fe (produto do gene *nifH*) é um dímero γ_2 cuja massa molecular varia de aproximadamente 58 a 72 kDa conforme o microrganismo

(EADY, 1986).

Apesar do complexo da nitrogenase possuir apenas estes 3 polipeptídeos, sua atividade depende dos produtos de muitos outros genes. Em *Klebsiella pneumoniae* foram identificados 20 genes especificamente relacionados com a fixação de nitrogênio (genes *nif*), dos quais 14 são essenciais para a produção da nitrogenase ativa (MERRICK, 1992). Tanto a síntese quanto a atividade deste complexo enzimático são altamente reguladas. Em *K. pneumoniae*, o microrganismo melhor estudado em termos de regulação da fixação de nitrogênio, a expressão dos genes *nif* é regulada positivamente pela proteína NifA (MERRICK & EDWARDS, 1995). A expressão do gene *nifA* é regulada pela proteína NtrC, cuja atividade é controlada pelo sistema de regulação do metabolismo de nitrogênio, sistema NTR. Este sistema envolve a participação das proteínas PII, NtrB, NtrC, GS (glutamina sintetase), GlnD (uridilil transferase/enzima removedora de uridilil), GlnE ou ATase (adenil transferase/enzima removedora de adenilil) e GlnK (proteína paróloga a PII).

1.3. O envolvimento da proteína PII no sistema NTR

A proteína PII, produto do gene *glnB*, é um homotrímero cujos monômeros são compostos por 112 resíduos de aminoácidos. A PII é uma proteína transdutora de sinal presente em vários organismos desde bactérias até eucariotos. Em bactérias, a proteína PII é essencial para o processamento e integração de sinais dos níveis de carbono e nitrogênio. A informação produzida é utilizada para controlar a assimilação de nitrogênio (NINFA & ATKINSON, 2000).

Em *K. pneumoniae*, a proteína PII interage com as proteínas GlnD, NtrB e GlnE e com os moduladores ATP e 2-oxoglutarato em resposta aos níveis de nitrogênio celular (ADLER *et al.*, 1975; ENGLEMAN & FRANCIS, 1978; KAMBEROV *et al.*, 1994a; KAMBEROV *et al.*, 1994b; ATKINSON *et al.*, 1994).

Em baixos níveis de amônio intracelular, a proteína GlnD tem atividade de uridililtransferase e promove a uridililação do resíduo tirosina 51 da proteína PII (SON & RHEE, 1987). PII-UMP não interage com a proteína NtrB que sofre autofosforilação no resíduo de His139 (WEISS & MAGASANIK, 1988). Este grupamento fosforil é transferido da proteína NtrB para o resíduo Asp54 do domínio N-terminal da proteína NtrC (SANDERS *et al.*, 1992; KLOSE *et al.*, 1993). Na forma fosforilada (NtrC-P) ativa a transcrição dos promotores dependentes de σ^N do gene *glnA* e do operon *nifLA* (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Quando os níveis de glutamina sobem, reflexo do aumento de NH_4^+ intracelular e da atividade da glutamina sintetase, a proteína GlnD tem atividade de enzima removedora de UMP e desuridilila a proteína PII (NINFA *et al.*, 1995; KAMBEROV *et al.*, 1994). Na forma livre, a proteína PII interage com a proteína NtrB, que cataliza a remoção do grupo fosfato da proteína NtrC-P, inativando-a (NINFA & MAGASANIK, 1986). Na forma desfosforilada, NtrC é incapaz de ativar a expressão dos genes envolvidos no metabolismo alternativo de nitrogênio (ATKINSON *et al.*, 1994).

A proteína PII é também responsável pela modulação da atividade da adenililtransferase (produto do gene *glnE*) (NINFA *et al.*, 1995; JAGGI *et al.*, 1997). Em níveis baixos de amônio, o complexo PII-UMP/GlnE é capaz de

catalisar a remoção de grupamentos AMP da glutamina sintetase ativando-a; enquanto que em condições de altos níveis de amônio a proteína PII não modificada estimula a atividade de adenililtransferase da proteína GlnE, que transfere um grupamento AMP para a glutamina sintetase tornando-a inativa (STADTMAN *et al.*, 1970; RHEE *et al.*, 1985; JAGGI *et al.*, 1997).

O gene *glnK*, isolado inicialmente de *Escherichia coli*, codifica para uma proteína que apresenta 67% de identidade com a proteína PII (van HEESWIJK *et al.*, 1996). O resíduo de Tyr 51 é conservado em GlnK e esta proteína é uridililada por extrato livre de células de um mutante *glnB* de *E. coli*. A proteína GlnK e a proteína PII apresentam uma sobreposição parcial de funções na regulação do metabolismo de nitrogênio, no entanto uma não substitui completamente a outra (ATKINSON & NINFA, 1998). A análise da sequência a montante ao gene *glnK* revelou a presença de um sítio de ligação para NtrC e uma sequência consenso para promotor do tipo σ^N , sugerindo que a expressão de *glnK* é dependente de NtrC. Esta observação foi confirmada pela ausência de expressão do gene *glnK* no mutante duplo *glnB ntrC* (van HEESWIJK *et al.*, 1996).

O alinhamento das proteínas PII e GlnK de seis organismos indica que estas duas proteínas são caracterizadas por diferenças em apenas 5 dos seus 112 resíduos de aminoácidos (resíduos 3, 5, 52, 54 e 64) (JACK *et al.*, 1999). Em *E. coli*, a expressão simultânea de PII e GlnK *in vivo* resulta na síntese de duas espécies de heterotrímeros: GlnK/(PII)₂ e (GlnK)₂/PII (van HEESWIJK *et al.*, 2000). Estes heterotrímeros provavelmente se formam devido a alta similaridade entre as proteínas. A eficiência destes heterotrímeros na ativação da proteína glutamina

sintetase é intermediária entre os homotrimeros de GlnK e PII, o que sugere que a formação destes heterotrimeros pode promover uma regulação mais refinada da adenililação de GS (van HEESWIJK *et al.*, 2000).

Em *H. seropedicae* o gene *glnB* foi isolado e caracterizado (BENELLI *et al.*, 1997). Recentemente, o gene *glnK* também foi isolado neste organismo, porém sua sequência ainda não está completa (NOINDORF, comunicação pessoal).

Em *Azoarcus* sp. BH72, além das proteínas PII (GlnB) e GlnK, foi identificada uma terceira paróloga, a proteína GlnY. Assim como a proteína GlnK de *E. coli*, esta proteína só é expressa em baixos níveis de amônio (MARTIN *et al.*, 2000). A proteína GlnY também possui o resíduo Tyr 51 conservado e, uma vez traduzida, é encontrada somente na forma uridililada (MARTIN *et al.*, 2000).

A proteína PII e sua paróloga GlnZ participam do sistema regulatório dos níveis de nitrogênio em *A. brasilense* (de ZAMAROCZY, 1998). Mutantes *glnB* são Nif⁻, excretam amônio quando crescidos na presença de nitrato e a captação de amônio está diminuída. Por outro lado mutantes *glnZ* são Nif⁺, mas o transporte de amônio está aumentado. A superexpressão de GlnZ diminui drasticamente o transporte de amônio em *A. brasilense* (de ZAMAROCZY, 1998).

Em *Azorhizobium caulinodans* nem PII, nem GlnK são necessários para fixação de nitrogênio em estado de vida livre. (MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1997) Entretanto, o mutante *glnB* é incapaz de fixar nitrogênio em condições simbióticas (Fix⁻), enquanto que o mutante *glnK* tem fenótipo Fix⁺. As proteínas PII e GlnK tem um efeito na adenililação de GS (MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1997; MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1998). No mutante duplo *glnB glnK* de *A. caulinodans* a desadenilação de GS é fortemente prejudicada em condições de desrepressão da

nitrogenase. Neste duplo mutante a atividade da nitrogenase está desreprimida em altos níveis de amônio indicando que as proteínas PII e GlnK estão envolvidas na regulação da fixação de nitrogênio (MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1999).

1.4. O envolvimento das proteínas PII e GlnK no controle da atividade de NifA

Nos diazotrofos da subdivisão γ das proteobactérias como *K. pneumoniae*, a atividade da proteína NifA é controlada pela proteína NifL. Em altas concentrações de amônio e/ou oxigênio, NifL funciona como inibidor da atividade da proteína NifA. O mecanismo pelo qual NifL atua sobre a atividade de NifA não é bem conhecido. HE *et al.* (1997) estudaram o efeito inibitório de NifL de *K. pneumoniae* em diferentes mutantes de *E. coli* e mostraram que os produtos dos genes *ntrC*, *ntrB* e *glnD*, mas não o do gene *glnB*, são necessários para eliminar o efeito inibitório de NifL sobre NifA na ausência de amônio. Um plasmídeo contendo o gene *ntrC* constitutivo que funciona como ativador de transcrição mesmo sem estar fosforilado, restaurou a atividade normal de NifL. Este resultado mostra que os genes *ntrB* e *glnD* participam apenas indiretamente deste controle e os autores sugeriram que o controlador de NifL é o produto de algum gene cuja expressão é dependente de NtrC-P, possivelmente o gene *glnK*.

Este mesmo grupo mostrou que no mutante *glnK* de *E. coli*, NifL funciona como inibidor permanente de NifA (HE *et al.*, 1998). Quando o gene *glnK* foi expresso a partir de um plasmídeo, NifL voltou a funcionar normalmente,

confirmando a sugestão do trabalho anterior. Além disso os autores também mostraram que a proteína GlnK não precisa estar uridililada para ter efeito sobre NifL (HE *et al.*, 1998). JACK *et al* (1999) mostraram o mesmo efeito de GlnK sobre a atividade da proteína NifA utilizando estirpes mutantes de *K. pneumoniae* e sugeriram que ocorre uma interação direta entre GlnK e NifA.

Resultados recentes mostram que a atividade de NifA é maior no mutante duplo *glnB glnK* do que no mutante *glnK* de *E. coli*, sugerindo que a proteína PII pode antagonizar o efeito de GlnK no alívio da inibição de NifL sobre NifA (ARCONDÉGUY *et al.*, 1999). Utilizando um gene *glnK* mutagenizado no resíduo Tyr 51, os autores mostraram que este efeito é mais notável quando GlnK está na forma não uridililada. Quando a proteína PII foi superexpressa em um mutante *glnK* de *E. coli* a atividade de NifA foi semelhante a apresentada pela estirpe selvagem, indicando que PII é capaz de substituir GlnK no controle da inibição de NifA por NifL (ARCONDÉGUY *et al.*, 1999).

Nos diazotrofos da subdivisão α das proteobactérias como *Azospirillum brasilense*, um gene homólogo a NifL não foi detectado e neste caso a própria proteína NifA parece ser inativada por oxigênio e/ou amônio. Em *A. brasilense* o gene *nifA* aparentemente é expresso na presença de oxigênio e/ou amônio (LIANG *et al.*, 1991), sugerindo que neste organismo poderia existir um mecanismo de controle de atividade de NifA, uma vez que a expressão dos genes *nif* é regulada por oxigênio e amônio. ARSENE *et al.* (1996), sugeriram que PII controla a atividade da proteína NifA em *A. brasilense*, embora não tenham demonstrado que PII interage diretamente com a proteína NifA.

Entre os membros da subdivisão β das proteobactérias, *H. seropedicae* é o microrganismo melhor estudado em termos de genética de fixação de nitrogênio (SOUZA *et al.*, 1991a; SOUZA *et al.*, 1991b; SOUZA *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 1996; PEDROSA *et al.*, 1997; KLASSEN *et al.*, 1999; REGO *et al.*, 1997; STEFFENS *et al.*, 1997; WASSEM *et al.*, 2000). Neste organismo, o gene *nifL* não foi detectado. Dados fisiológicos mostram que a expressão do gene *nifA* neste diazotrofo é insensível aos níveis de oxigênio, mas é reprimida por amônio e dependente de NtrC. Resultados recentes mostram que a proteína NifA de *H. seropedicae* tem sua atividade controlada por amônio e oxigênio (SOUZA *et al.*, 1999). Os resultados obtidos com uma proteína NifA N-truncada sugerem que o domínio N-terminal pode estar envolvido no monitoramento dos níveis de nitrogênio fixado do meio (SOUZA *et al.*, 1997a; SOUZA *et al.*, 1999). O fenótipo Nif de *A. brasilense* estirpe FP9 (*ntrC*) foi complementado pelo gene *nifA* de *H. seropedicae* truncado mas não pelo *nifA* nativo, sugerindo que neste mutante falta um ativador ou há um inibidor da atividade de NifA que age sobre o domínio N-terminal. Como a estirpe FP9 apresenta baixo nível de expressão do gene *glnB* (de ZAMAROCZY *et al.*, 1993), estes resultados sugerem que possivelmente a proteína PII participe da modulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* (SOUZA *et al.*, 1997a).

O mutante *glnB* de *H. seropedicae* não fixa nitrogênio mas apresenta níveis normais de expressão de NifA, sugerindo que a proteína PII de *H. seropedicae* controla a atividade de NifA. Dados de difração de raios-X sugerem que a proteína PII de *H. seropedicae* apresenta estrutura semelhante à proteína GlnK de *E. coli*

(BENELLI *et al.*, 2000; XU *et al.*, 1998). A região C-terminal da proteína PII de *H. seropedicae* apresenta um motivo estrutural em hélice 3₁₀ similar ao observado na proteína GlnK de *E. coli* mas ausente na proteína PII de *E. coli*. De fato, a proteína PII de *H. seropedicae* parece ser funcionalmente semelhante a proteína GlnK de *E. coli*. Enquanto a proteína GlnK de *K. pneumoniae* controla indiretamente a atividade de NifA, aliviando a inibição de NifL sobre NifA em condições de desrepressão (HE *et al.*, 1998), a PII de *H. seropedicae* parece controlar diretamente a atividade de NifA, como em *A. brasilense* (BENELLI *et al.*, 1999; ARSENE *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que a região C-terminal da proteína PII de *H. seropedicae* pode estar envolvida na sinalização dos níveis de nitrogênio para NifA (BENELLI *et al.*, 1999). Para avaliar a importância da região C-terminal da proteína PII de *H. seropedicae*, foram construídos mutantes do gene *glnB*. Em um dos mutantes, obtido por mutagênese sítio dirigida, os resíduos Gly108 e Pro109 que estão localizados na região do motivo em hélice 3₁₀, foram substituídos por dois resíduos de alanina e esta proteína foi denominada PII-AA (BONATTO *et al.*, 2000). O outro gene mutante foi obtido por mutagênese aleatória e apresenta quatro substituições de resíduos: Gln3-Arg; Thr5-Ala; Gly87-Cys; Gly108-Trp e codifica para a proteína denominada PII-AL (BONATTO *et al.*, 2000).

1.5. OBJETIVOS

- Clonagem dos genes *glnB* mutagenizados em vetor de expressão;
- Indução e expressão das proteínas PII contendo mutações pontuais;
- Purificação das proteínas PII mutantes.

2 METODOLOGIA

2.1. Estirpes e plasmídeos

As estirpes e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela

1.

2.2. Condições de cultivo e antibióticos

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Broth ou Terrific Broth (SAMBROOK *et al.*, 1989) à 30 ou 37°C. Os antibióticos usados foram: canamicina (50 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml) e ampicilina (250 µg/ml).

As culturas de *E. coli* foram mantidas em glicerol 50% e estocadas à -20°C.

2.3. Manipulação gênica

As reações de restrição, ligação, purificação de DNA e as técnicas de eletroporação e transformação foram realizadas conforme descrito por SAMBROOK *et al* (1989).

2.4. Clonagem dos genes *glnB* mutagenizados em vetor de expressão

O gene *glnB* de *H. seropedicae* mutagenizado na região C-terminal foi obtido a partir de uma PCR mutagênica sítio dirigida na qual foi utilizado um primer

complementar a região C-terminal que continha duas alterações de nucleotídeos. Essas alterações provocaram a substituição de dois resíduos de aminoácidos, Gly108 e Pro109 por dois resíduos de Ala. Este gene mutante foi clonado no vetor pTZ18R originando o plasmídeo pACB2 (BONATTO *et al.*, 2000). Este plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Bam*HI. O fragmento *Xba*I/*Bam*HI de 380 pb foi ligado no vetor de expressão pET28b+ digerido com as mesmas enzimas, através de uma reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase.

O plasmídeo pACB50 contém o gene *glnB* de *H. seropedicae* mutagenizado aleatoriamente clonado no vetor pTZ18R (BONATTO *et al.*, 2000). Este gene mutante foi obtido através de uma PCR mutagênica aleatória, na qual foram utilizadas condições que diminuem a eficiência da enzima TAQ DNA polimerase. O plasmídeo pACB50 também foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Bam*HI. O inserto de 380 pb contendo o gene *glnB* mutante foi ligado no vetor pET28b+, tratado com as mesmas enzimas. As reações de ligação foram eletroporadas na *E. coli* estirpe 71-18 e as colônias transformantes foram selecionadas em meio LA contendo 50 µg/mL de canamicina. O DNA das colônias foi tratado com endonucleases e analisado em gel de agarose 1,5%.

2.5. Expressão das proteínas PII mutantes

Os plasmídeos pACB3 e pACB51 contendo os genes *glnB* mutagenizados, foram introduzidos por eletroporação na *E. coli* estirpe RB9065λDE3. Para verificar se as proteínas mutantes PII-AA e PII-AL estavam sendo expressas, uma

colônia de cada transformante foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo 0,2% de glutamina, 10 µg/mL de tetraciclina e 50 µg/mL de canamicina, e incubadas por 12 horas em agitador rotatório a 30° C. Em seguida, 100 µL destas culturas foram novamente inoculadas em 20 mL do mesmo meio. Após 2 horas de incubação a 37° C, foi adicionado 1 mmol/L de IPTG (isopropil-tio-galactosídeo) e as culturas foram novamente incubadas. Alíquotas de 0, 1, 2 e 4 horas foram retiradas e analisadas por eletroforese.

2.6. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes

2.6.1. Eletroforese nas condições descritas por LAEMMLI (1970)

Para verificar se as proteínas PII-AA e PII-AL estavam sendo expressas na estirpe RB9065λDE3 de *E. coli*, o extrato bruto de células foi submetido a eletroforese sob condições desnaturantes. As amostras foram diluídas 2 ou 5 vezes em tampão de amostra (Tris-HCl 12 mmol/L (pH 6,8), glicerol 5%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mmol/L e azul de bromofenol 0,02%). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos, centrifugadas por 5 minutos e as alíquotas foram aplicadas em gel de acrilamida. A concentração do gel separador foi de 20% e foi preparado pela adição de 5 mL de solução estoque de acrilamida (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida), 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 mol/L (pH 8,8) e SDS 0,4%; 2,4 mL de H₂O destilada, 100 µL de persulfato de amônio 10% e 10 µL de TEMED (N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina). O gel empilhador

continha 0,6 mL de solução estoque de acrilamida, 1 mL de Tris-HCl 0,5mol/L (pH 6,8) e SDS 0,3%. A eletroforese foi feita a 150 V em tampão Tris 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L e SDS 0,1% (pH 8,3). Ao lado das amostras foi aplicado um marcador de massa molecular.

2.6.2. Eletroforese sob condições desnaturantes para proteínas de baixo peso molecular

Para verificar o rendimento da superexpressão e das etapas de purificação da proteína PII-AA, o extrato bruto de células ou alíquotas da proteína foram submetidos a eletroforese nas condições descritas por SCHAGGER & von JAGOW (1987). Estas condições são indicadas para proteínas de 1 a 100 kDa porque permitem uma melhor separação entre as bandas de baixa massa molecular.

As amostras foram preparadas como descrito no item 2.6.1. A concentração do gel separador foi de 15% e foi preparado pela adição de 3 mL de solução estoque de acrilamida (30% de acrilamida e 0,8% de bis acrilamida), 2 mL de tampão do gel (Tris-HCl 3 mol/L pH 8,45 e SDS 0,3%), 1 mL de glicerol, 75 μ L de persulfato de amônio 10% e 7,5 μ L de TEMED. O gel empilhador continha 0,4 mL de solução estoque de acrilamida, 0,75 mL de tampão do gel, 1,85 mL de H₂O destilada, 20 μ L de persulfato de amônio 10% e 2 μ L de TEMED. A eletroforese for corrida a 120 V nos tampões cátodo (Tris 100 mmol/L, tricina 100mmol/L, SDS 0,1%, pH 8,25) e ânodo (Tris 200 mmol/L pH 8,9).

Os géis foram corados com comassie blue R250 como descrito por BENELLI (1997).

2.7. Sequenciamento

O plasmídeos pACB2 e pACB50, que contêm os genes *glnB* de *H. seropedicae* mutagenizados e clonados no vetor pTZ18R, foram sequenciados para verificar a integridade destes genes. Estes plasmídeos foram purificados da estirpe de *E. coli* DH10B. O sistema para a reação de sequenciamento continha aproximadamente 0,2 μ L do DNA purificado, 0,5 μ L de *primer* Reverso ou Universal e 4 μ L de mistura para sequenciamento Big Dye, em um volume final de 20 μ L. A reação foi aquecida inicialmente a 95°C por 5 minutos (1 ciclo) e em seguida foram realizados 25 ciclos: 96°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 60°C por 6 minutos. O produto de cada reação foi precipitado utilizando 10 μ L acetato de amônia 7,5 mol/L e 2 volumes de etanol 96%, e em seguida lavado com 500 μ L etanol 70%. O DNA foi dissolvido em 4 μ L de Formamide Loading Dye (96° C por 2 minutos) e submetido a eletroforese no sequenciador automático de DNA da Applied Biosystems ABI-PRIZM 377 (Perkin-Elmer).

2.8. Dosagem de proteínas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). O padrão de proteína utilizado foi soro albumina bovina.

2.9. Purificação da proteína PII-AA

2.9.1. Indução da expressão da proteína PII-AA em larga escala

Para obter uma quantidade de proteína superexpressa suficiente para a purificação, três colônias de *E. coli* estirpe RB9065 λ DE3 contendo o plasmídeo pACB3 (expressa a proteína PII-AA) foram inoculadas em 20 mL de meio LB contendo 0,2% de glutamina, 10 μ g/mL de tetraciclina e 50 μ g/mL de canamicina e incubadas por 14 horas em agitador rotatório a 30° C. Estas culturas foram diluídas em 1 L de LB (DO₆₀₀ final 0,03) contendo 0,5% de lactose e incubadas por 5 horas a 37° C. As células foram coletadas por centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 12 mL de tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 200 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, glicerol 20%). Em seguida foi adicionado PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonyl) 1 mmol/L e a mistura foi congelada a -70° C.

2.9.2. Purificação da proteína PII-AA por cromatografia

As células ressuspensas em tampão de sonicação foram incubadas com 50 μ g/mL de lisozima em gelo por 30 minutos e sonicadas por 30 segundos 5 vezes com intervalos de 1 minuto. O lisado foi centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de estreptomicina 2% (concentração final), para precipitação de ácidos nucleicos e incubado sob agitação por 30 minutos a 0°

C. Em seguida, o lisado tratado foi centrifugado a 18000 rpm por 30 minutos e a solução sobrenadante foi diluída 4 vezes com tampão A (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L). Esta preparação foi aplicada em uma coluna DEAE Sepharose (Pharmacia; aproximadamente 29 mL) pré-equilibrada com tampão A e conectada a um sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography, Pharmacia). O sistema foi operado a um fluxo de 2 mL/minuto. Após a lavagem da coluna com tampão A, a proteína PII-AA foi eluída com um gradiente de concentração de KCl de 0,05 (tampão A) a 1,0 mol/L (tampão B: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 1 mol/L, EDTA 1 mmol/L). Durante a eluição foram coletadas 50 alíquotas de 2 mL a um fluxo de 2 mL/minuto. As amostras foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) e agrupadas em três diferentes frações de acordo com a quantidade de proteína. Uma destas frações foi dialisada em 2L de tampão C (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0 e KCl 50 mmol/L) por 16 horas. Em seguida esta amostra foi aplicada em uma coluna Agarose-Heparina (Pharmacia; 11 mL) com fluxo de 1 mL/minuto e previamente equilibrada com tampão C. Após a lavagem da coluna com tampão C, a proteína PII-AA foi eluída com um gradiente de concentração de KCl de 0,05 (tampão C) a 1,0 mol/L (tampão D: Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0 e KCl 1 mol/L). Foram coletadas 50 alíquotas de 1 mL a um fluxo de 1 mL por minuto. As alíquotas foram analisadas em gel de acrilamida e as frações que continham a proteína PII-AA foram dialisadas em tampão C contendo glicerol 50%. Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4° C e a proteína foi estocada a -20° C.

Tabela 1. Estirpes e plasmídeos.

ESTIRPES / PLASMÍDEOS	GENÓTIPO / FENÓTIPO	REFERÊNCIA / FONTE
<i>E. coli</i>		
71-18	F <i>lacI^q (lacZ)M15 proA+B+/ (lac-proAB) thi supE</i>	Biolabs
RB9065 λ DE3	(<i>glnB2306 glnD99::Tn10, Tc^R</i> promotor T7 polimerase)	BENELLI, 1997
DH10B	F ⁻ <i>mrcA</i> Δ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 endA1</i> <i>recA1 deoR</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>araD139</i> . <i>galU galK nupG rpsL</i> λ ⁻	Gibco-BRL
Plasmídeos		
pET28b+	Km ^R , plasmídeo de expressão com promotor T7	Novagem
pACB2	Amp ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> mutagenizado na região C-terminal em pTZ18R	BONATTO <i>et al.</i> , 2000
pACB3	Km ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> mutagenizado na região C-terminal em pET28b+	Este trabalho
pACB50	Amp ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> mutagenizado aleatoriamente em pTZ18R	BONATTO <i>et al.</i> , 2000
pACB51	Km ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> mutagenizado aleatoriamente em pET28b+	Este trabalho

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Clonagem dos genes *glnB* de *H. seropedicae* mutagenizados em vetor de expressão

Os genes *glnB* contendo mutações na região C-terminal (Gly108-Ala e Pro109-Ala) e aleatórias (Gln3-Arg; Thr5-Ala; Gly87-Cys; Gly108-Trp) foram clonados no vetor de expressão pET28b+. Os fragmentos de 380 pb *XbaI*-*Bam*HI isolados dos plasmídeos pACB2 e pACB50, respectivamente, foram ligados no vetor pET28b+ digerido com as mesmas enzimas (Figura 1). As reações de ligação foram eletroporadas em *E. coli* estirpe 71-18. As colônias transformantes foram selecionadas em meio LA contendo o antibiótico canamicina, que é a marca de resistência do vetor pET28b+. Para confirmar a presença do inserto, o DNA das colônias foi isolado, purificado e analisado por eletroforese em gel de agarose após digestão com endonucleases.

O plasmídeo contendo o gene *glnB* mutagenizado na região C-terminal no vetor pET28b+ foi denominado pACB3. Para determinar a presença do inserto, este plasmídeo foi digerido com a enzima *Bam*HI e sua migração eletroforética foi comparada com a do vetor pET28b+ digerido com a mesma enzima. O tratamento com esta enzima produz apenas um corte tanto no vetor como no plasmídeo. A presença do inserto foi confirmada já que o plasmídeo pACB3 migra mais lentamente que o vetor (Figura 2).

A construção do gene *glnB* mutagenizado aleatoriamente no vetor pET28b+ foi denominado pACB51. Este plasmídeo foi tratado com a enzima *Bgl*II que

reconhece um sítio de restrição no vetor e um no gene *glnB*. Desta forma, a digestão com esta enzima produz um fragmento de aproximadamente 300 pb quando o plasmídeo contém o inserto. Através de análise por eletroforese foi possível confirmar a presença do inserto pela presença do fragmento de 300 pb (Figura 3).

3.2. Expressão das proteínas PII mutantes pelos plasmídeos pACB3 e pACB51

O plasmídeo pACB3 contém o gene *glnB* de *H. seropedicae* mutagenizado na região C-terminal (Gly108-Ala e Pro109-Ala) inserido no vetor pET28b+. Estes resíduos de aminoácidos estão localizados no motivo em hélice 3₁₀, região de maior diferença estrutural entre as proteínas PII de *H. seropedicae* e de *E. coli*. A proteína PII-AA foi expressa a partir do plasmídeo pACB3 em *E. coli* estirpe RB9065λDE3. Esta estirpe de *E. coli* é um mutante duplo *glnB glnD* e foi utilizada para evitar a contaminação da proteína purificada com a proteína PII de *E. coli* e para obter a proteína PII-AA na sua forma não uridililada. Além disso, esta estirpe carrega o bacteriófago λDE3 no cromossomo que contém o gene da T7 RNA polimerase e cuja expressão está sob controle do promotor *lac* (BENELLI, 1997).

O plasmídeo pACB51 também foi introduzido na *E. coli* estirpe RB9065λDE3 por eletroporação. Este plasmídeo contém o gene *glnB* de *H. seropedicae* mutagenizado aleatoriamente inserido no vetor pET28b+. Este gene apresenta quatro substituições de resíduos: Gln3-Arg, Thr5-Ala, Gly87-Cys e

Gly108-Trp (BONATTO *et al.*, 2000). O resíduo 87 pode fazer parte da sequência de ligação ao ATP e o resíduo 108 se localiza no início do motivo em hélice 3_{10} da região C-terminal.

Em ensaios preliminares para determinar se os plasmídeos construídos eram capazes de expressar as proteínas PII mutantes o agente indutor foi o IPTG (isopropil-tio-galactosídeo). A figura 4 mostra que *E. coli* RB9065 λ DE3 contendo o plasmídeo pACB3 foi capaz de expressar uma proteína com taxa de migração eletroforética correspondente a massa molecular de aproximadamente 12 kDa após 1 hora de indução. Este resultado sugere que o plasmídeo é capaz de expressar a proteína mutante uma vez que a massa molecular esperada para o monômero da proteína PII-AA é de 12,3 kDa. Por outro lado o padrão eletroforético de proteínas de células de *E. coli* RB9065 λ DE3 pACB51 induzidas não mostrou a presença de proteína com massa molecular esperada para a proteína PII-AL (Figura 4). Para confirmar este resultado novas colônias transformantes foram testadas, mas nenhuma foi capaz de expressar a proteína com taxa de migração semelhante à da PII-AL, sugerindo que pACB51 não contém um gene funcional.

3.3. Sequenciamento dos genes *glnB* mutantes

Para determinar se a sequência dos genes *glnB* mutantes estava correta e se, durante o processo de mutagênese, não houve introdução de mudanças de fase de leitura, os insertos dos plasmídeos pACB2 (PII-AA) e pAC50 (PII-AL)

foram completamente sequenciados. A análise das sequências mostrou que o gene que codifica para a proteína PII-AA possui duas modificações de bases (G para C; C para G) que corresponde à mudança esperada dos aminoácidos Gly108 e Pro109 para duas alaninas (Figura 5). O gene que codifica para a proteína PII-AL, por outro lado, possui deleção de uma citosina na posição 124 em relação ao início de tradução (Figura 6). Esta deleção não tinha sido notada no sequenciamento anterior. A falta deste nucleotídeo, que fazia parte de um códon que codifica para o resíduo 42, provocou uma mudança na fase de leitura que, além de impedir a tradução correta da proteína, ocasiona terminação prematura 38 nucleotídeos antes do códon de terminação natural. Este resultado justifica a falta da expressão de proteína com massa molecular de 12Kda pela *E.coli* RB9065 λ DE3 pACB51. Desta forma, somente a proteína PII-AA foi superexpressa e purificada.

3.4. Purificação da proteína mutante PII-AA

Para obter uma quantidade de proteína suficiente para a purificação, a proteína PII-AA foi superexpressa a partir do plasmídeo pACB3 (Figura 7). Este plasmídeo foi inserido na *E. coli* RB9065 λ DE3 por eletroporação e colônias transformantes foram selecionadas e inoculadas em meio de cultura para a indução. Nos ensaios de superexpressão a lactose foi utilizada como indutor da T7 RNA polimerase. A opção do uso de lactose em lugar do IPTG, baseou-se em resultados recentes que mostraram que a lactose pode substituir o IPTG como

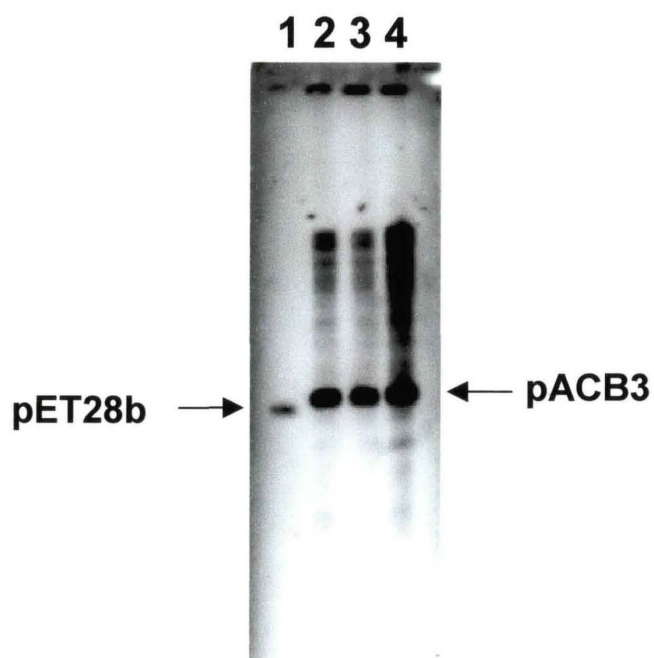
agente indutor (MONTEIRO *et al.*, 2000). As células coletadas após a indução foram lisadas, tratadas com sulfato de estroptomicina e centrifugadas para remover proteínas insolúveis e ácidos nucleicos. O lisado tratado foi diluído no tampão adequado para ser aplicado na coluna de purificação.

A proteína PII-AA foi purificada primeiramente em uma coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose). As alíquotas coletadas da coluna DEAE foram analisadas através de eletroforese em gel de acrilamida e foram agrupadas em três porções de acordo com a concentração relativa de PII-AA. Nesta etapa o rendimento da purificação foi baixo, sendo que cerca de 30% da proteína foi eluída antes do pico de eluição, que ocorreu na concentração aproximada de 400 mmol/L de KCl (Figura 8).

A fração que aparentava maior grau de pureza foi dialisada para retirar o excesso de KCl da solução e aplicada em uma coluna de afinidade (Agarose-Heparina). As frações coletadas desta coluna foram analisadas por eletroforese e as amostras que continham maior quantidade relativa da proteína PII-AA foram agrupadas. O pico de eluição na coluna de afinidade ocorreu em uma concentração de aproximadamente 600 mmol/L de KCl. O grau de pureza da proteína PII-AA nas frações agrupadas, determinado por análise densitométrica, foi de 88% (Figura 9).

O protocolo utilizado para purificar a proteína PII-AA foi baseado no protocolo de purificação da proteína PII nativa de *H. seropedicae* descrito por BENELLI (1997), no entanto as duas proteínas apresentaram comportamentos diferentes quanto a resposta à concentração de KCl. A baixa eficiência de ligação da proteína PII-AA na coluna DEAE-Sepharose pode ser devido ao pH dos

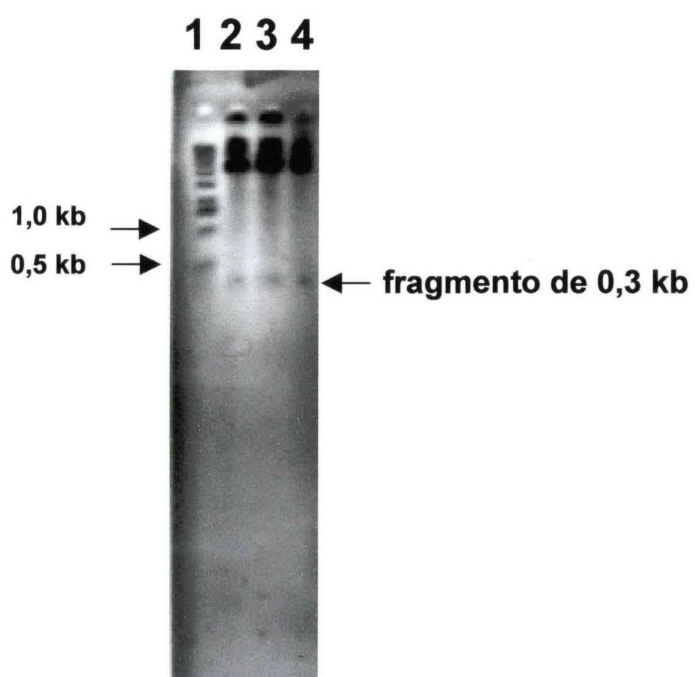
tampões utilizados estarem abaixo do ideal. A tabela 2 mostra a concentração de proteína e a proteína total de cada etapa da purificação.

FIGURA 2 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PLASMÍDEO pACB3

Linha 1 – pET28b+ digerido com *Bam*HI;

Linhas 2, 3 e 4 – pACB3, que contém o gene *glnB* de *H. seropedicae* mutagenizado na região C-terminal clonado em pET28b+, digerido com *Bam*HI.

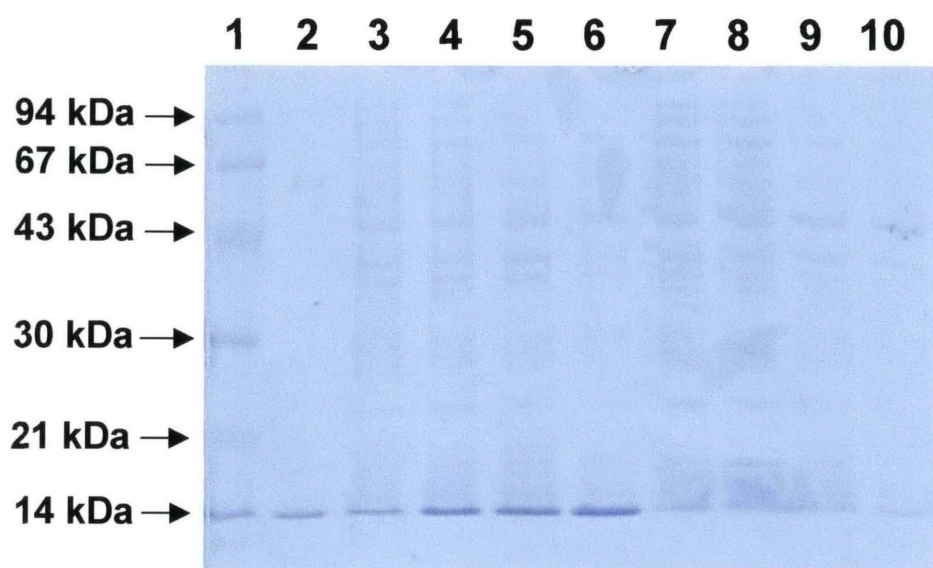
FIGURA 3 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO PLASMÍDEO pACB51



Linha 1 – Marcador 1Kb ladder (Life Technologies);

Linhas 2, 3 e 4 – pACB51, que contém o gene *glnB* de *H. seropedicae* mutagenizado aleatoriamente clonado em pET28b+, digerido com *Bgl*II.

FIGURA 4 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PII-AA E PII-AL EM *E. coli* (RB9065 λ DE3)



Linha 1 - marcador de massa molecular (Pharmacia);

Linha 2 – proteína PII nativa de *H. seropedicae*;

Linhas 3 a 6 - extrato bruto de *E. coli* RB9065 λ DE3 - pACB3 (PII-AA) após 0, 1, 2 e 4 horas de indução com IPTG 1 mmol/L a 37° C;

Linhas 7 a 10 - extrato bruto de *E. coli* RB9065 λ DE3 – pACB51 (PII-AL) após 0, 1, 2 e 4 horas de indução com IPTG 1 mmol/L a 37° C.

FIGURA 5 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS PII E PII-AA DE *H. seropedicae*

```

PII      ATGAAACAAGTGACCGCCATCATCAAACCGTTCAAGCTGGACGAGGTGCGTGAATCCCTC
PII-AA   ATGAAACAAGTGACCGCCATCATCAAACCGTTCAAGCTGGACGAGGTGCGTGAATCCCTC
          *****

PII      GCCGAAGTCGGCGTCACGGGCCTGACGGTCACCGAAGTGAAAGGCTTCGGGCGCCAGAAG
PII-AA   GCCGAAGTCGGCGTCACGGGCCTGACGGTCACCGAAGTGAAAGGCTTCGGGCGCCAGAAG
          *****

PII      GGCCATACCGAACTCTATCGCGGTGCTGAATACGTGGTCGACTTCCTGCCCAAGGTCAAG
PII-AA   GGCCATACCGAACTCTATCGCGGTGCTGAATACGTGGTCGACTTCCTGCCCAAGGTCAAG
          *****

PII      ATCGAAGTCGTGGTGGACGACAAGGTGGTCGAGCAGGCTGTGGACGCCATCATCAAGGCC
PII-AA   ATCGAAGTCGTGGTGGACGACAAGGTGGTCGAGCAGGCTGTGGACGCCATCATCAAGGCC
          *****

PII      GCCCGCACCGGCAAGATCGGCGACGGCAAGATCTTCGTGCAGGAAGTGGAGCAGGTGATC
PII-AA   GCCCGCACCGGCAAGATCGGCGACGGCAAGATCTTCGTGCAGGAAGTGGAGCAGGTGATC
          *****

PII      CGTATCCGTACCGGCGAAACCGGGCCGGATGCCGTCTGA
PII-AA   CGTATCCGTACCGGCGAAACCGGGCCGGATGCCGTCTGA
          ***** * *****

```

O alinhamento da sequência de nucleotídeos dos genes que codificam para as proteínas PII nativa e PII-AA que possui as substituições Gly108-Ala e Pro109-Ala foi realizado através do programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997).

FIGURA 6 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS PII E PII-AL DE *H. seropedicae*

```

PII      ATGAAACAAGTGACCGCCATCATCAAACCGTTCAAGCTGGACGAGGTGCGTGAATCCCTC
PII-AL   ATGAAACGAGTGGCCGCCATCATCAAACCGTTCAAGCTGGACGAGGTGCGTGAATCCCTC
*****  ****  *****

PII      GCCGAAGTCGGCGTCACGGGCCTGACGGTCACCGAAGTGAAAGGCTTCGGGCGCCAGAAG
PII-AL   GCCGAAGTCGGCGTCACGGGCCTGACGGTCACCGAAGTGAAAGGCTTCGGGCGCCAGAAG
*****  ****  *****

PII      GGCCATACCGAACTCTATCGCGGTGCTGAATACGTGGTCGACTTCCTGCCCAAGGTCAAG
PII-AL   GGC-ATACCGAACTCTATCGCGGTGCTAGAATACGTGGTCGACTTCCTGCCCAAGGTCAAG
***     *****

PII      ATCGAAGTCGTGGTGGACGACAAGGTGGTCGAGCAGGCTGTGGACGCCATCATCAAGGCC
PII-AL   ATCGAAGTCGTGGTGGACGACAAGGTGGTCGAGCAGGCTGTGGACGCCATCATCAAGGCC
*****

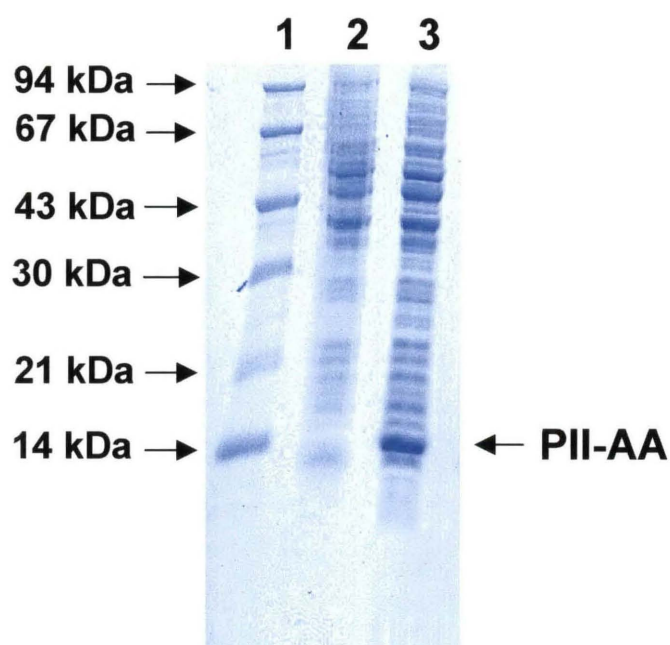
PII      GCCCCACCGGCAAGATCGGCGACGGCAAGATCTTCGTGCAGGAAGTGGAGCAGGTGATC
PII-AL   GCCCCACCGGCAAGATCTGCGACGGCAAGATCTTCGTGCAGGAAGTGGAGCAGGTGATC
*****

PII      CGTATCCGTACCGGCGAAACCGGGCCGGATGCCGTCTGA
PII-AL   CGTATCCGTACCGGCGAAACCTGGCCGGATGCCGTCTGA
*****

```

O alinhamento da sequência de nucleotídeos dos genes que codificam para as proteínas PII nativa e PII-AL foi realizado através do programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997).

FIGURA 7 - INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PII-AA POR LACTOSE EM *E. coli* (RB9065 λ DE3)

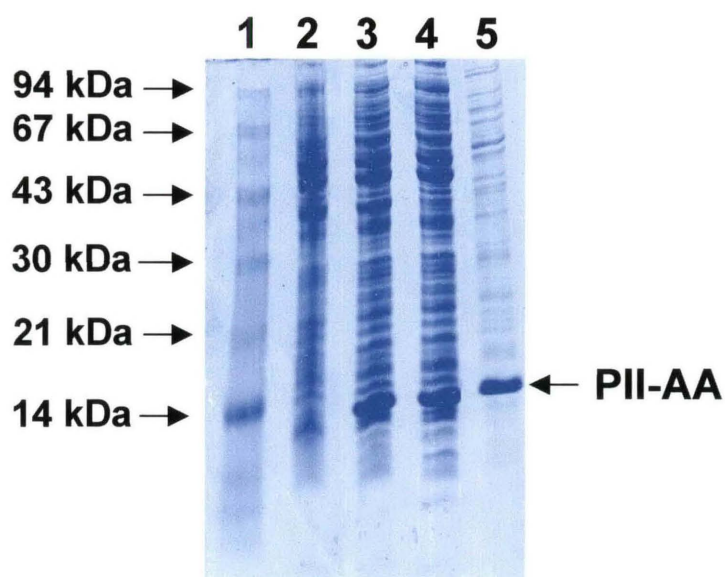


Linha 1 - marcador de massa molecular (Pharmacia);

Linha 2 - extrato bruto de *E. coli* RB9065 λ DE3 - pET28b+ após 5 horas de indução com lactose 0,5%;

Linha 3 - extrato bruto de *E. coli* RB9065 λ DE3 - pACB3 (PII-AA) após 5 horas de indução com lactose 0,5%.

FIGURA 8 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA PROTEÍNA MUTANTE PII-AA APÓS PURIFICAÇÃO NA COLUNA DEAE SEPHAROSE



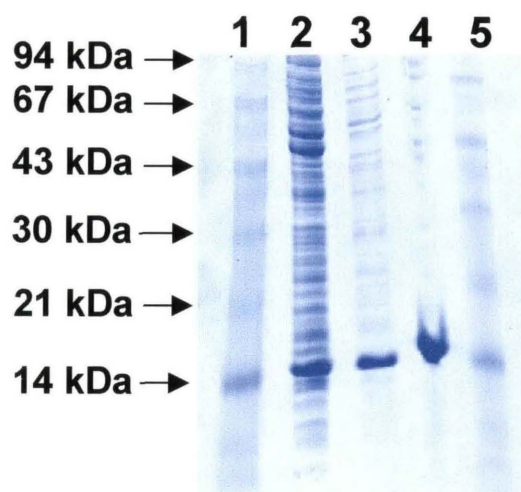
Linha 1 - marcador de massa molecular (Pharmacia);

Linha 2 - extrato bruto de *E. coli* RB9065 λ DE3 (pET28b+) após indução com lactose 0,5%;

Linhas 3 e 4 - extrato bruto e extrato bruto lisado de *E. coli* RB9065 λ DE3 pACB3 – (PII-AA) após indução com lactose 0,5%;

Linha 5 – proteína PII-AA após purificação na coluna DEAE Sepharose (Pharmacia).

FIGURA 9 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA PROTEÍNA MUTANTE PII-AA APÓS PURIFICAÇÃO NA COLUNA AGAROSE-HEPARINA



Linhas 1 e 5 - marcador de massa molecular (Pharmacia);

Linha 2 - extrato bruto de *E. coli* RB9065 λ DE3 - pACB3 (PII-AA) após indução com lactose 0,5%;

Linha 3 - proteína PII-AA após cromatografia na coluna DEAE Sepharose (Pharmacia)

Linha 4 - proteína PII-AA após cromatografia na coluna Agarose-Heparina (Pharmacia).

TABELA 2 – TABELA DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PII-AA

Amostra	Concentração	Proteína Total	Grau de Pureza
Extrato bruto	20,4 mg/mL	244,8 mg	-
Extrato bruto lisado (após centrifugação)	13,99 mg/mL	139,9 mg	-
Lisado tratado com sulfato de estreptomicina (após centrifugação)	9,19 mg/mL	110,3 mg	-
Fração após cromatografia na coluna DEAE Sepharose	391,4 µg/mL	8,61 mg	-
Fração após cromatografia na coluna Agarose-Heparina	619,4 µg/mL	1,05 mg	88 %

4 CONCLUSÕES

- Dois alelos do gene *glnB* de *H. seropedicae* contendo mutações foram clonados no vetor de expressão pET28b+ originando os plasmídeos pACB3 e pACB51;
- A proteína mutante PII-AA foi superexpressa a partir do plasmídeo pACB3;
- A massa molecular apresentada pelo monômero da proteína PII-AA em gel SDS-PAGE foi semelhante a proteína PII nativa, aproximadamente 12,5 kDa;
- A proteína mutante PII-AA foi purificada com um grau de pureza de 88%.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 250, p. 6264-6272, 1975.

ARCONDÉGUY, T.; van HEESWIJK, W. C.; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS**. vol. 180, p. 263-270, 1999.

ARSENE, 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. **J Bacteriol.**, Washington, v. 178, p.4830-4838, 1996.

ATKINSON, M.R.; KAMBEROV, E.S.; WEISS, R. E.; 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). **J. Biol. Chem.** , Bethesda, v.269, p. 28288-28293, 1994.

ATKINSON, M.R.; NINFA, A. J. Role of GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 29(2), p. 431-447, 1998.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehavot, v. 13, p. 65-73, 1992.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidences for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, Elaine Machado. Análise Estrutural e Funcional da Proteína PII, Controladora da Fixação de Nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1997. 200p. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; MOORE, M.; HARPER, A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. The PII protein of *Herbaspirillum seropedicae*: structure, kinetic properties and role in the regulation of nitrogen fixation. *In: Highlights on nitrogen fixation research.* p. 201-205, 1999.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; BONATTO, A. C.; BUCK, M.; MOORE, M.; HARPER, A.; POLIKARPOV, I.; PEDROSA, F. O. Role of PII protein as a

signal of nitrogen level in *Herbaspirillum seropedicae*. In: **Nitrogen Fixation: from the molecules to crop productivity**. Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 105-106, 2000.

BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. CHUBATSU, L. S.; BENELLI, E. M. Functional difference between the PII proteins from *Herbaspirillum seropedicae* and *Klebsiella pneumoniae* In: **Nitrogen Fixation: from the molecules to crop productivity**. Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.128, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

DEAN, R. D.; BOLIN, J. T.; ZHENG, L. Nitrogenase metalloclusters: structure, organization and synthesis. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, n. 21, p. 6737, 1993.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional Organization of the *glnB-glnA* Cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 2507-2515, 1993.

de ZAMAROCZY, M. structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 29(2), p. 449-463, 1998.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: endophytic N₂ fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, (São Paulo), v.44, p. 310-313, 1992.

EADY, R. R. Enzymology of free-living diazotrophs. In BROUGHTON, W. J. and PUHLER, A., ed. **Nitrogen Fixation**. Oxford, Clarendon Press, v. 4, p. 1-49, 1986.

ENGLEMAN, E. G.; FRANCIS, S. H. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 191, p. 602-612, 1978.

HE, L.; SOUPENE, E.; KUSTU, S. NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p.7446-7455, 1997.

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. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, p6661-6667, 1998.

JACK, R.; de ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181(4), p. 1156-1162, 1999.

JAGGI, R.; van HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; OLLIS, D. L.; VASUDEVAN, S. G. Intramolecular signal transduction in adenylyltransferase may coordinate the opposing activities of two distinct domains. In: 11th INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION (1997 : Paris). **Resumos...** Paris : Instituto Pasteur, p. 62, 1997b.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. **Mol. Cell. Biol. Res.**, v. 40, p. 175-191, 1994a.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Effect of mutation in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, p. 28294-28299, 1994b.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *H. seropedicae*. **FEMS.**, vol. 181, p. 165-170, 1999.

- KLOSE, K. E.; WEISS, D. S.; KUSTU, S. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NtrC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. **J. Mol. Biol.**, v. 232, p.67-78, 1993.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, (Lond.), v. 277, p. 680-685, 1970.
- LIANG, Y.Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 5, p. 2735-2744, 1991.
- MACHADO, I. M. P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 1599-1602, 1996.
- MARTIN, D. E.; HUREK, T; REINHOLD-HUREK, B. Occurrence of three PII-like signal transmitter proteins in the diazotrophic proteobacterium *Azoarcus* sp. BH72. **Mol. Microbiol.**, v. 38(2), p. 276-288, 2000.
- MERRICK, M. J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, p. 835-876, 1992.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Reviews.**, vol. 59(4), p 604-622, 1995.

MICHEL-REYDELLET, N; DESNOUES, N.; ELMERICH, C.; KAMINSKI, P. A. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* *glnB* and *glnA* genes: involvement of the PII protein in symbiotic nitrogen fixation. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 3580-3587, 1997.

MICHEL-REYDELLET, N; DESNOUES, N.; de ZAMAROCZY, M; ELMERICH, C.; KAMINSKI, P. A. Characterization of the *glnK-amtB* operon and involvement of AmtB in methylammonium uptake in *Azorhizobium caulinodans*. **Mol. Gen. Genet.** v. 258, p. 671-677, 1998.

MICHEL-REYDELLET, N; KAMINSKI, P. A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, p. 2655-2658, 1999.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Use of lactose to induce expression of soluble NifA protein domains of *Herbaspirillum seropedicae* in *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol.** v. 46, p. 1087-1090, 2000.

NAGATAMI, H.; SHIMIZU, M.; VALENTINE, R. C. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 79, p. 164-175, 1971.

NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; FENG, J.; NINFA, E. G. Control of the nitrogen assimilation by the NR_I – NR_{II} Two-component system of enteric bacteria. In: HOCH J. A.; SILHAVY, T. J. Two-component signal transduction. Washington: ASM Press, p. 67-88, 1995.

NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends in Microbiology**. vol. 8 (4), p. 172-179, 2000.

NINFA, A. J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 83, p. 5909-5913, 1986.

PEDROSA, F. O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. M. P.; STEFFENS, M. B. R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; ISHIDA, M. L.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, Exeter, v. 29, p. 843-846, 1997.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans*. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant. Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 61-65, 1991.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 252p.

REGO, F. G. M.; PEDROSA, F. P.; YATES, M. G.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Regulation of *nifB* gene of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVIª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997 : Caxambu). **Resumos...** Caxambu , 1997. p. 50.

RHEE, S. G.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 113, p. 213-241, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New york: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; BURLINGAME, A. L.; KOSHLAND, D. E. Jr. Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent

intermediate activates transcription. **J. Bacteriol.**, Washington, v.174, p. 5117-5122, 1992.

SCHAGGER, H.; von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166(2), p. 368-379, 1987.

SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 262, p. 8690-8695, 1987.

SOUZA EM, FUNAYAMA S, RIGO LU, PEDROSA FO. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 37, p. 425-429, 1991a.

SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 137, p. 1511-1522, 1991b.

SOUZA, E.M.; DRUMMOND, M. H.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. M.; YATES, M.G. The N-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA is involved in the NH₄⁺ activity regulation. Submetido, 1997a.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U.; YATES, M.G.

Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, Washington, vol. 181(2), p. 681-684, 1999.

STADTMAN, E.R.; GINSBURG, A.; CIARDI, J.E.; YEH, J.; HENNING, S.B.;

SHAPIRO, B.M. Multiple molecular form of glutamine synthetase produced by enzyme catalysed adenylation and deadenylation reaction. **Adv. Enzyme Regul.**, Kidlington, v. 8, p. 99-118, 1970.

STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. P.; SOUZA, E. M.; MACHADO, H. B.;

PERSUHN, D. C.; RIGO, L. U. Sequence analyses of the regulatory genes *ntxB* and *ntxC* of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVI^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997 : Caxambu). **Resumos...** Caxambu , 1997. p. 50.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS,

D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** 25(24):4876-4882, 1997.

van HEESWIJK, W.C., S. HOVING, D. MOLENAAR, B. STEGEMAN, D. KAHN, H.

V. WESTERHOFF. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 21, p. 133-146, 1996.

van HEESWIJK, W.C.; WEN, D.; CLANCY, P.; JAGGI, R.; OLLIS, D. L.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers *in vivo*: Fine tuning the nitrogen signal cascade. **PNAS**, v. 97, p. 3942-3947, 2000.

WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, Oxford, vol. 35(4), p. 756-764, 2000.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, . I.; DÖBEREINER J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants. **Plant and Soil**. 210:103-113, 1999.

WEISS, V.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 85, p. 8919-8923, 1988.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; van HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H.V.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J. Mol. Biol.** Sep 11;282(1):149-65,1998.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In:
STACEY,G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen
Fixation**. London: Chapman & Hall, New York, 1992. p.43-86.