

RAFAEL MAZER ETTO

MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA DO DOMÍNIO N-
TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *Herbaspirillum*
seropedicae

Monografia apresentada à disciplina BQ001,
como requisito parcial à conclusão do Curso
de Ciências Biológicas, Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor
Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Berenice R.
Steffens

CURITIBA
2003

À minha filha Letícia Naomi

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Paraná pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, seus professores e funcionários pelo auxílio e amizade.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de pesquisa e trabalho no grupo de Fixação de Nitrogênio.

Aos professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, Leda Chubatsu, Elaine Benelli, Liu Un Rigo, Giseli Klassen, Leonardo Cruz e Cynthia Picheth pela dedicação, dicas e idéias.

À minha co-orientadora Roseli Wassen e ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelas discussões e idéias para o enriquecimento deste trabalho.

À minha orientadora Maria Berenice Steffens pelos ensinamentos, conselhos, estímulo, carinho e amizade dedicados, fundamentais para o bom transcorrer desta monografia, enriquecendo a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Valter pela amizade e dedicação no preparo das seqüências

À Dona Julieta e Roseli Prado pelo carinho maternal demonstrado a todos do Laboratório.

A Dona Marilza e Nancy pela ajuda nos serviços burocráticos

A Ro da Coordenação do Curso de Ciências Biológicas pela amizade, ajuda, carinho e dedicação.

Ao Marco Randi, Coordenador do Curso de Ciências Biológicas, pela ajuda, amizade, churrascos e futebol.

Aos amigos Humberto Ramos, Luciano, Carol, Stefan, Roseadele, Lílian, Luiza, Ana Cláudia e Fabi pelas idéias, dicas, generosidades e “camaradagens” no decorrer deste trabalho.

Aos “pseudo-intelectuais” Ju Inaba, Patilene e o jornalista André Salamandra pelos conselhos filosóficos que não influenciaram em nada neste trabalho, mas renderam muitas boas risadas.

Aos amigos Lys, Helisson, Geraldo, Daniel, Karen, Ana, Dani, Michele, Marco, Marcelo, Adriana I., Augusto, Fabrício, Luis e Tiago, Adriana T., Juliana Ramos, André Luiz, Andréa Tarzia, Lauren, Roberta, Giovani, Gus e Renata pelas risadas, amizade e ajuda.

A galera do futebol pelos momentos de descontração e por manter a tradição de nunca ganhar um jogo disputado

Aos amigos do Curso de biologia Gú, Rafa, Gilson, Sil, Paola, Thaís, Lú, Idinha, Louri, Igor, Fernando, Felipe, Carlinha, Fer, Nai, Li, Ju, Zé, Rodriguinho e Kleiton pelas festas, ajuda e amizade.

A todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

À Dr^a Vera pelas consultas, carinho e amizade.

A Priscila por demonstrar que coragem e dedicação são essenciais para se alcançar um objetivo.

À tia Reiko, tia Helena, Ester e Tuti pelo exemplo e dedicação despendidos a minha filha.

A Loli pela paciência, carinho, dedicação e ajuda que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu pai pelo companheirismo e carinho despendidos na educação da minha filha, aos meus avós Chico e Maria pela coragem e determinação, à minha avó Angelina pelo carinho e ajuda nos momentos em que precisei. Ao meu irmão pelo companheirismo, ajuda e amizade. À minha mãe pela dedicação, carinho e exemplo que influenciaram diretamente na minha formação.

Agradeço em especial a minha filha por ter servido de fonte de inspiração e estímulo em tudo o que faço.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é um organismo fixador de nitrogênio (diazotrófico) que possui potencial aplicação como fertilizante biológico. A regulação da expressão dos genes que codificam proteínas/enzimas envolvidas na fixação de nitrogênio, genes *nif*, é dependente do controle da expressão e atividade da proteína NifA. Nos diazotrofos, esta proteína atua como ativador transcricional de promotores genes *nif* σ^N dependentes. A proteína NifA apresenta três domínios estruturais: o domínio C-terminal com um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado e responsável pela ligação ao DNA; o domínio Central com um motivo de ligação de ATP e envolvido na interação com a subunidade sigma da RNA polimerase e na formação o complexo aberto; e o domínio N-terminal, que apresenta o menor grau de similaridade entre as proteínas NifA e está envolvido no controle da atividade por nitrogênio fixado. A atividade da NifA em *H. seropedicae* é controlada por amônia e oxigênio. O controle por amônia está relacionado ao domínio N-terminal, uma vez que a proteína sem este domínio é ativa na ausência de oxigênio, independente dos níveis de amônia. Para ampliar a compreensão, a nível molecular, do mecanismo de controle por amônia do domínio N-terminal, alguns aminoácidos foram substituídos através de mutagênese sítio-dirigida deste domínio. Após a comparação da seqüência de aminoácidos da NifA de *Azospirillum brasilense*, *Rhodobacter capsulatus* e *H. seropedicae*, os resíduos de valina nas posições 40 e 138 foram escolhidos para substituição por ácido glutâmico. A seqüência de nucleotídeos do domínio N-terminal da NifA selvagem de *H. seropedicae* foi clonada no vetor de expressão pET28a, originando o plasmídeo pLET. Este plasmídeo foi utilizado como DNA molde nas ampliações do domínio N-terminal da NifA e será utilizado como controle das mutagêneses sítio-dirigida e dos posteriores testes fisiológicos. O estudo dos efeitos das mutações sítio-dirigidas contribuirá para a melhor compreensão do mecanismo de controle do domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae* pelo nitrogênio.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Estirpes de bactérias.....	12
Quadro 2- Plasmídeos.....	12
Quadro 3- Listagem de antibióticos com suas respectivas concentrações.....	13
Quadro 4- Códon e resíduos de aminoácidos substituídos pelos “primes” Mutagênicos.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da estrutura da proteína Nifa de <i>H.seropedicae</i>	5
Figura 2 - Comparação da seqüência de aminoácidos do domínio N-Terminal das proteínas Nifa de <i>A. brasilense</i> , <i>R. capsulatus</i> e <i>H. seropedicae</i>	22
Figura 3 - Padrão eletroforético de fragmentos contendo o domínio N-terminal da NifA de <i>H.seropedicae</i>	24
Figura 4 - Padrão eletroforético dos clones analisados.....	25
Figura 5 - Padrão eletroforético para identificação do clone contendo o domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i>	26
Figura 6 - Mapa do plasmídeo pLET.....	27
Figura 7 - Seqüência de nucleotídeos do domínio N-terminal NifA de <i>H. seropedicae</i>	28
Figura 8 - Padrão eletroforético dos “megaprimers”.....	31
Figura 9 - Seqüência de nucleotídeos do domínio N-terminal NifA de <i>H. seropedicae</i> mutado com o “primer” MUTV40E-R.....	32
Figura 10 - Esquema ilustrativo da estratégia de mutagênese sítio dirigida utilizando o “primer” mutagênico MUTV40E-R.....	33
Figura 11 - Seqüência de nucleotídeos do domínio N-terminal NifA de <i>H. seropedicae</i> mutado com o “primer” MUTV138E-U.....	35
Figura 12 - Esquema ilustrativo da estratégia de mutagênese sítio dirigida utilizando o “primer” mutagênico MUTV138E-R.....	36

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i>	1
1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	2
1.3 <i>A PROTEÍNA NifA</i>	3
1.4 <i>CONTROLE DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA</i>	5
2. OBJETIVOS.....	11
3. METODOLOGIA	12
3.1 <i>BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS</i>	12
3.2. <i>REAGENTES</i>	12
3.3. <i>MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO</i>	12
3.4. <i>ANTIBIÓTICOS</i>	13
3.5. <i>PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA E LARGA ESCALA</i>	13
3.6. <i>PREPARAÇÃO RÁPIDA DE PLASMÍDEOS</i>	13
3.7. <i>CLIVAGEM DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO</i>	13
3.8. <i>AMPLIFICAÇÃO E MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA REGIÃO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA</i>	14
3.9. <i>SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DO DNA</i>	16
3.10. <i>PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO</i>	16
3.11. <i>SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS</i>	16
3.11.1. Desfosforilação do vetor.....	16
3.13.2. Ligação do fragmento de DNA ao vetor.....	17
3.14. <i>TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO</i>	17
3.15 <i>SEQUENCIAMENTO DO DNA</i>	17
3.15.1. Preparo do material para sequenciamento.....	18
3.15.2. Reação de sequenciamento.....	18
3.15.3. Análise das seqüências de DNA.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 <i>CLONAGEM DO DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA</i>	23
4.2 <i>MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA</i>	29
4.2.1 Estratégia de mutagênese sítio dirigida.....	30
5. CONCLUSÃO.....	37
6. PERSPECTIVAS	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXO 01- VETOR PET28A.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria Gram-negativa vibrióide que pertence à subdivisão β das Proteobactérias. É um microrganismo diazotrofo endofítico que foi isolado em 1986 por BALDANI *et al.* A importância atribuída ao gênero *Herbaspirillum* provém da sua associação com gramíneas de interesse econômico como milho, sorgo e cana-de-açúcar (DOBEREINER, 1992). Em certas regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil, por mais de cem anos não foi necessário utilizar adubação nitrogenada, sugerindo que o nitrogênio fixado biologicamente, principalmente pelos endofíticos *Herbaspirillum* spp. e *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, possa ter contribuído de maneira significativa para o metabolismo nitrogenado da planta (DOBEREINER, 1992). Além disso, estudos realizados por OLIVARES e colaboradores (1997) indicaram que o *H. seropedicae* pode fornecer fitormônios para a planta, favorecendo dessa forma, seu desenvolvimento.

Tendo em vista que o *H. seropedicae* possui potencial aplicação como fertilizante biológico, o estudo dos genes relacionados com a fixação e o metabolismo de nitrogênio, bem como sua regulação, pode auxiliar no esclarecimento dos processos bioquímicos envolvidos. O Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular desta Universidade vem estudando esse microrganismo há mais de 15 anos e já foram identificados e seqüenciados os genes *nifA* (SOUZA *et al.*, 1991 a e b), *nifB* (REGO *et al.*, 1997), *glnAntrBC* (PERSHUN *et al.*, 2000), *recA* (STEFFENS *et al.*, 1993), *nifHDK* (MACHADO *et al.*, 1996), *glnB* (BENELLI *et al.*, 1997), *recX* (GALVÃO *et al.*, 1998 e 2003), *glnKamtB* (NOINDORF *et al.*, 1999), *nifENXorf1orf2* (KLASSEN *et al.*, 1999), *nifQmodABC* e *fixXC* (KLASSEN, 2000) e *orf4modEorf5orf6* (VOIGT, 2000).

Aparentemente, os genes *nif* de *H. seropedicae* já seqüenciados estão organizados em duas regiões separadas: uma contendo os genes contíguos *nifA* e

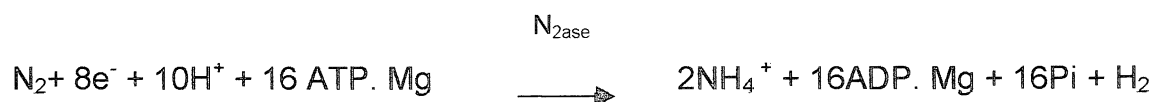
nifB (SOUZA *et al.*, 1991 b) e outra região contendo o operon *nifHDKENXorf1orf2orf3* (KLASSEN *et al.*, 1999). A região contendo os genes *nifQ* e *modABC*, 3kpb a jusante do operon *nifHDKENXorf1orf2orf3*, pode constituir um único operon (KLASSEN, 1999). Os genes *fixXC* foram encontrados a jusante de *nifQmodABC* mas são transcritos no sentido oposto (KLASSEN, 2000).

A interação *Herbaspirillum*-planta está sendo estudada e a expressão do gene *nifA* já foi confirmada em gramíneas (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). O genoma de *H. seropedicae* Z78 foi comparado, por eletroforese em campo pulsado, com outras estirpes (Soares-Ramos *et al.*, 2003, no prelo).

Atualmente, está em andamento o Programa Genoma do Paraná (Genopar) que tem por objetivo o sequenciamento do genoma completo desta bactéria.

1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Todos os seres vivos necessitam de nitrogênio para a biossíntese de importantes macromoléculas, como proteínas e ácidos nucléicos. Contudo a crosta terrestre contém pouco nitrogênio na forma assimilável e o nitrogênio atmosférico, embora abundante (cerca de 80%), não é assimilado diretamente pela maioria dos seres vivos. Os microorganismos diazotróficos são os únicos capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônio (NH_4^+), processo denominado fixação biológica de nitrogênio. A fixação do nitrogênio é catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase (POSTGATE, 1982), cuja reação geral é a seguinte:



Esse processo ocorre em condições especiais: baixas concentrações de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio, presença de metais (molibdênio e

magnésio) e temperatura adequada (POSTGATE, 1982).

O complexo nitrogenase é formado por uma metaloenzima constituída por duas proteínas distintas, a dinitrogenase redutase ou proteína ferro (proteína-Fe), e a dinitrogenase ou proteína ferro-molibdênio (proteína-FeMo). Estas unidades reunidas na presença de ATP e de uma fonte de baixo potencial de redução promovem a formação de amônia (POSTGATE, 1982).

A síntese de uma nitrogenase ativa requer a transcrição de um grande número de genes da fixação de nitrogênio (*nif*). Em diazotrofos, os operons *nif* são transcritos a partir de promotores dependentes de σ^N ativados pela proteína NifA (LEE *et al.*, 1993). Esta proteína, que é um ativador transcricional, atua juntamente com o fator σ^N para iniciar o processo de transcrição. Portanto, a proteína NifA exerce um papel central como ativadora da transcrição dos genes *nif*, necessários para a síntese e atividade da nitrogenase (RUDNICK *et al.*, 1997).

A amônia é virtualmente a fonte de nitrogênio preferida para o desenvolvimento bacteriano, proporcionando uma maior taxa de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas. Embora existam várias evidências de que a amônia atravesse a membrana bacteriana por difusão, tem sido sugerida a existência de um sistema transportador ativo desse composto, denominado Amt (MERRICK & EDWARDS, 1995).

1.3 A PROTEÍNA NifA

O papel da NifA como ativadora transcricional para expressão dos genes *nif* foi descrito pela primeira vez em *K. pneumoniae* (FISCHER, 1994). Comparações entre seqüências de várias proteínas NifA mostraram que seu tamanho pode variar de 519 a 626 aminoácidos e que consiste de 3 domínios estruturais com variável grau de conservação (FISCHER, 1994). Sua estrutura parece apresentar características comuns a muitos ativadores transcpcionais, que regulam a expressão de genes em conjunto com a RNA polimerase σ^N (MERRICK, 1992).

O domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice altamente

conservado e envolvido na ligação ao DNA, em que a primeira hélice mostra um significativo grau de conservação entre todos os ativadores dependentes de σ^N e a segunda hélice é específica das proteínas NifA. Este domínio está ligado ao domínio central através de uma região interdomínio (LID) de 32 a 44 resíduos e, no caso das proteínas NifA de *Rhizobium sp.*, *H. seropedicae* e *Azospirillum brasilense* apresenta duas cisteínas, que em conjunto com outras duas do domínio central formam um motivo Cys-X₁₁-Cys-X₁₉-Cys-X₄-Cys, o qual constitui um potencial sítio de ligação de metais (FISCHER, 1994; SOUZA *et al.*, 1991b; LIANG *et al.*, 1991).

O domínio central apresenta cerca de 240 aminoácidos e possui um motivo característico de ligação ao ATP, provavelmente envolvido na interação com a subunidade σ^N da RNA polimerase e com a formação do complexo aberto. Este é o domínio catalítico da proteína NifA (LEE *et al.*, 1993).

Entre o domínio central e o N-terminal existe uma região interdomínio, cuja função é manter unidos esses dois domínios funcionais. Essa região interdomínio é geralmente encontrada em proteínas moduladoras de sistemas de transdução e é denominada "Q-linker", devido ao alto conteúdo de resíduos de glutamina e outros aminoácidos hidrofílicos (FISCHER, 1994).

O domínio N-terminal é o que apresenta o menor grau de conservação da seqüência de aminoácidos entre as proteínas NifA e aparentemente apresenta função regulatória (FISCHER, 1994).

A seqüência de aminoácidos deduzida da proteína NifA de *H. seropedicae* apresenta 542 resíduos (SOUZA *et al.*, 1991a). Estudos comparativos mostraram que esta também possui os três domínios estruturais (N-terminal, central e C-terminal) e as duas regiões interdomínios LID e "Q-linker", comuns a maioria das proteínas NifA (MONTEIRO *et al.*, 1999a) (figura 1).

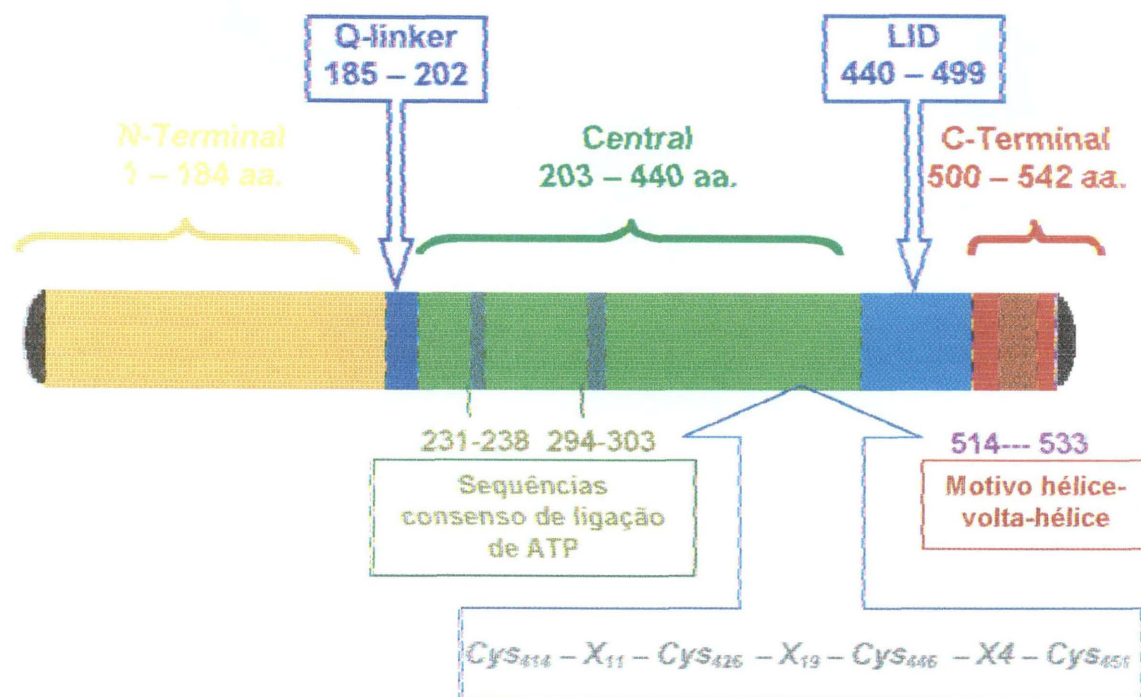


Figura 1 – Esquema representativo da estrutura da proteína NifA de *H. seropedicae*. Os números que aparecem abaixo do domínio Central indicam a localização das seqüências de aminoácidos consenso de ligação de ATP (resíduos 231 a 238 e 294 a 303), e os números que aparecem abaixo do domínio C-terminal indicam a localização dos resíduos que formam o motivo hélice-volta-hélice (514 a 533). (Fonte: Monteiro, 2001).

1.4 CONTROLE DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA

A regulação da transcrição dos genes *nif* é mediada inteiramente pela regulação da expressão e controle da atividade da proteína NifA. Os níveis de amônia e oxigênio e a disponibilidade de elementos metálicos no meio parecem influenciar esse sistema de regulação (MERRICK, 1992).

Nos microrganismos *K. pneumoniae* (BERGER *et al.*, 1995) e *A. vinelandii* (HILL, *et al.*, 1996), a ativação dos genes *nif* pela proteína NifA é controlada pela proteína sensora NifL. A atividade de NifA é inibida por NifL em resposta aos altos

níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. Nesses organismos o sensoriamento do estado redox é feito via domínio N-terminal da proteína NifL, que contém o fator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (SCHMITZ, 1997; HILL *et al.*, 1996). A proteína NifL na sua forma oxidada é capaz de inibir a atividade de NifA, mas quando é convertida na forma reduzida, NifL não atua mais como um anti-ativador (HILL *et al.*, 1996). A proteína NifL de *K. pneumoniae* (HE *et al.*, 1998) e *A. vinelandii* (JACK *et al.*, 1999) também atua como proteína sensora dos níveis de nitrogênio fixado, via uma proteína semelhante a PII, denominada GlnK. Em condições de excesso de amônia, a proteína GlnK de *A. vinelandii* não está na forma uridililada, sendo capaz de interagir com o domínio C-terminal de NifL, o que aumenta a habilidade desta proteína em inibir NifA. Já em condições limitadas de amônia, a uridililação de GlnK previne sua interação com NifL e conseqüentemente a atividade de NifA não é inibida (LITTLE *et al.*, 2002). Em *Klebsiela pneumoniae* a proteína GlnK, independente do seu estado de uridililação, é necessária para manter NifL inativa em baixos níveis de nitrogênio (HE *et al.*, 1998). Entretanto, a proteína PII pode antagonizar o efeito inibitório de GlnK sobre a atividade de NifL, provavelmente devido a formação de heterotrimeros da proteína GlnK e PII, inativando a proteína GlnK (ARCONDEGUY *et al.*, 1999).

A proteína NifA de *Azospirillum brasilense*, um diazotrofo pertencente à subdivisão α das Proteobactérias, é sintetizada em baixos níveis de oxigênio mas de forma independente de amônia (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999). Neste organismo onde também não foi detectado o gene *nifL*, a atividade da NifA parece ser regulada de acordo com os níveis de amônia, por um mecanismo mediado pela proteína PII (ZAMAROCZY *et al.*, 1993; LIANG *et al.*, 1992). Na ausência de amônia, PII parece ser necessária para manter a proteína NifA na forma ativa (ARSENE *et al.*, 1996). Já na presença de amônia, o domínio N-terminal da NifA aparentemente inibe sua atividade, provavelmente porque PII é incapaz de manter NifA na forma ativa. Essa sugestão é decorrente de experimentos utilizando a proteína NifA N-truncada (sem o domínio N-terminal). Os resultados mostraram que a proteína NifA N-truncada permanece ativa na presença de amônia ou na

ausência de PII, indicando que o domínio N-terminal participa da regulação da atividade da NifA por amônia, juntamente com a proteína PII (ARSENE *et al.*, 1996).

Diferente de outros diazotrofos, *Rhodobacter capsulatus* possui duas cópias funcionais do gene *nifA*, denominados *nifA1* e *nifA2*, os quais codificam proteínas NifA que diferem somente em seus 19 ou 22 aminoácidos da extremidade N-terminal respectivamente, sendo os 560 aminoácidos restantes idênticos entre elas (MASEPOHL *et al.*, 1988). Ao contrário do que acontece com as proteínas NifA de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, nas quais deleções do domínio N-terminal levaram a proteínas NifA ativas e tolerantes a amônia, mutantes da NifA1 de *R. capsulatus* que tiveram o domínio N-terminal eliminado total ou parcialmente, tornaram-se completamente inativos, tanto em *E. coli* quanto em *R. capsulatus* (PASCHEN *et al.*, 2001). Isso indica que o domínio N-terminal possa de alguma forma ser essencial para a atividade da NifA neste microrganismo.

O controle da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* tem sido investigado, tanto em sistemas *in vivo* quanto *in vitro* (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999a, 1999b e 2001a). Para estudos *in vitro* é necessária a obtenção de proteínas purificadas. A purificação de proteínas NifA tem-se mostrado difícil pela insolubilidade da proteína super-expressa que tende a formar agregados. Contudo, os domínios estruturais da NifA de *K. pneumoniae* expressos separadamente como proteínas de fusão foram parcialmente solúveis (LEE *et al.*, 1993). A partir desse fato e levando em consideração que a NifA de *H. seropedicae* apresenta domínios estruturais similares àqueles da NifA de *K. pneumoniae*, foi possível a expressão e purificação da proteína contendo somente os domínios central e C-terminal, denominada NifA N-truncada, e do domínio N-terminal isolado (MONTEIRO *et al.*, 1999a, 1999b e 2001a).

Experimentos para verificar a capacidade de ligação ao DNA mostraram que a proteína NifA N-truncada purificada liga-se especificamente a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* (MONTEIRO *et al.*, 1999a). Entretanto essa atividade foi inibida pelo domínio N-terminal da NifA purificado, já que o

complexo formado DNA – NifA N-truncada foi progressivamente desfeito quando o domínio N-terminal foi adicionado (MONTEIRO *et al.*, 2001a). A proteína NifA N-truncada também mostrou atividade ATPase *in vitro*, a qual apresentou um aumento de 2 vezes quando o promotor do gene *nifB* também estava presente. No entanto, a adição de quantidades crescentes do domínio N-terminal da NifA, que não possui atividade ATPase, inibiu essa atividade da NifA N-truncada. Sugeriu-se, então, que o domínio N-terminal interage especificamente com a proteína NifA N-truncada promovendo um efeito inibitório, o que foi reforçado pelos ensaios de proteção de proteólise que indicaram contato direto entre os domínios Central+C-terminal e o domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae in vitro* (MONTEIRO *et al.*, 2001a).

Paralelamente também foram efetuados experimentos *in vivo* para verificar a expressão e regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae*. A proteína NifA foi expressa em *E. coli* e testada quanto à capacidade de ativar a expressão do promotor *nifH* de *K. pneumoniae* (fusão *nifH:lacZ*). A proteína NifA selvagem de *H. seropedicae* apresentou-se inativa sob todas as condições testadas, indicando que é inerte quando expressa em Enterobactérias (SOUZA *et al.*, 1999). Contudo, a NifA N-truncada (sem o domínio N-terminal) foi capaz de ativar a transcrição do gene *nifH* de *K. pneumoniae*, mas somente na ausência de oxigênio. Este resultado é consistente com a hipótese de que a sensibilidade ao oxigênio não envolve o domínio N-terminal, mas sim o domínio Central e a região interdomínio (LID), que apresenta um motivo de cisteínas conservado e que possivelmente é um sítio para ligação de metais e sensor do estado redox celular. A atividade ferro-dependente da NifA N-truncada também reforça essa hipótese (SOUZA *et al.*, 1999). Recentemente Monteiro e colaboradores (2003) sugeriram que a sensibilidade da proteína NifA N-truncada ao oxigênio e à indisponibilidade de ferro estão relacionadas e que a proteína Fnr é essencial para a atividade e a estabilidade da proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* em *E. coli*. A proteína Fnr é o regulador transcricional responsável por mudar o metabolismo celular de aeróbio para anaeróbio em resposta ao oxigênio molecular, podendo ser um possível transdutor de sinal da disponibilidade de ferro intracelular (GREEN *et al.*,

1996).

Por outro lado, a proteína NifA N-truncada ativa a transcrição do gene *nifH* tanto na presença quanto na ausência de amônio, indicando que o domínio N-terminal (ausente nesta proteína) possa estar envolvido na resposta aos níveis de nitrogênio celular (MONTEIRO *et al.*, 1999a e SOUZA *et al.*, 1999). O controle da atividade de ativador transcricional da proteína NifA N-truncada pela presença de amônio, foi restabelecido somente quando o domínio N-terminal da NifA foi expresso "in trans" em *E. coli*, onde o domínio N-terminal foi capaz de inibir a atividade transcricional da NifA N-truncada em resposta aos níveis de nitrogênio fixado (MONTEIRO *et al.*, 1999b). Parece que o domínio N-terminal possa exercer um efeito inibitório sobre os outros domínios da NifA de *H. seropedicae*, em resposta a altas concentrações de amônio, atuando de maneira análoga à proteína NifL em *K. pneumoniae* (BERGER *et al.*, 1995) e *A. vinelandii* (HILL *et al.*, 1996). Também em *H. seropedicae* uma proteína PII foi identificada e parece estar envolvida no processo de sinalização de limitação de nitrogênio para a proteína NifA (BENELLI *et al.*, 1997).

Em vista das evidências de que o domínio N-terminal da proteína NifA de diversos diazotrofos está envolvido na regulação da atividade desta proteína de acordo com os níveis de nitrogênio, tem-se buscado elucidar ao nível molecular esse mecanismo de controle. Estudos cristalográficos da proteína NifA ainda não são conclusivos, devido a difícil solubilização da proteína super-expressa. Entretanto, resultados interessantes obtidos de experimentos de mutagênese e análise do comportamento fisiológico de diferentes mutantes, foram recentemente descritos (ARSENE *et al.*, 1999; PASCHEN *et al.*, 2001).

Em *A. brasilense* uma única mutação na posição 18 do domínio N-terminal da NifA, onde um resíduo de tirosina foi trocado por um de fenilalanina, foi suficiente para permitir o escape do controle de PII mas não do controle de amônia. A partir deste achado, especula-se que o resíduo de tirosina 18 possa ser essencial para interação direta entre NifA e PII, ou que possa ser alvo de modificações covalentes promovidas por uma proteína desconhecida, cuja

atividade esteja sob o controle de PII (ARSENE *et al.*, 1999).

Em *R. capsulatus*, tanto uma troca do aminoácido leucina por glutamina na posição 66, como a troca de valina por glutamato na posição 42 do domínio N-terminal da NifA, resultou em mutantes com atividade de NifA tolerante a amônio. Mutações na região interdomínio ID também resultaram em mutantes com atividade de NifA tolerante a amônio. Com esses dados se sugere que essas mutações possam afetar uma possível interação intramolecular dos domínios N-terminal e C-terminal, levando a tolerância da proteína NifA a amônio (PASCHEN *et al.*, 2001).

A seqüência deduzida de aminoácidos do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *H. seropedicae* apresentam um alto grau de identidade na região do resíduo de tirosina 18, podendo se indicar mecanismos similares de regulação da atividade da NifA nessas duas bactérias (ARSENE *et al.*, 1999). Desta forma, estudos de mutagênese já descritos na literatura podem orientar estudos semelhantes em *H. seropedicae*.

2. OBJETIVOS

Em 2001 Schmidt, em sua dissertação de Mestrado, deu início ao projeto de mutagênese do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*, visando contribuir para sua caracterização funcional. Para tanto foram planejados e sintetizados os oligonucleotídeos iniciadores mutagênicos (primers) MUTY18F; MUTV40E-R; MUTL52Q-R e MUTV138E-V. Foram obtidos dois plasmídeos derivados de mutagênese sítio-dirigida com o primer NifAmutY18F (SCHMIDT, 2003).

Neste trabalho pretendemos continuar a caracterização do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*, tendo-se como objetivos específicos:

- Obter seqüências mutantes da região N-terminal da proteína NifA, utilizando os “primers” MUTV40E-R e MUTV138E-V;
- Confirmação da presença das mutações por sequenciamento;
- Clonar as seqüências mutadas em vetor de expressão;
- Clonar a seqüência da N-terminal da proteína NifA selvagem em vetor de expressão.

3. METODOLOGIA

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes da bactéria *Escherichia coli* e plasmídeos que foram utilizadas neste trabalho estão nos quadros 01 e 02.

QUADRO 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIA

	Genótipo / Fenótipo	Referência
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)φ80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ rpsL nupG</i>	GRANT et al., 1990.
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10(tec^r)]</i>	Stratagene

QUADRO 2 – PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Características	Referência
pET28a	Vetor de expressão/promotor T7/canamicina ^R	Novagen
pEMS130	Contém a sequência codificadora da NifA de <i>H. seropedicae</i> subclonada no vetor pTZ18-R	SOUZA et al. (1991b)

^R confere resistência ao referido antibiótico

3.2. REAGENTES

Antibióticos, enzimas e reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Company, Merck Chemical Company, Amersham Biosciences, Invitrogen Inc. (Life Technologies – Gibco/BRL), British Drug House (BDH) e New England Biolabs.

3.3. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios líquidos LB (*Luria Broth*) ou SOC (SAMBROOK et. al., 1989) e agitação (130 rpm); ou em meio sólido LA (*Luria Broth* Ágar). Em ambos os casos a temperatura de incubação foi de 37° C.

3.4. ANTIBIÓTICOS

As concentrações finais dos antibióticos utilizados estão listados no quadro 3.

QUADRO 3 – LISTAGEM DE ANTIBIÓTICOS COM SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES

Antibióticos	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	250	250
Canamicina (Km)	100	50
Tetraciclina (Tc)	10	10

As soluções estoque foram preparadas como descrito por SAMBROOK *et al.*, 1989.

3.5. PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA E LARGA ESCALA

A extração de plasmídeos foi feita segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para a extração em larga escala, os volumes do método foram adaptados.

3.6. PREPARAÇÃO RÁPIDA DE PLASMÍDEOS

A extração rápida de plasmídeos foi feita segundo método descrito por Monteiro *et al.* (2001b).

3.7. CLIVAGEM DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O material (plasmídeo ou produto de amplificação) foi digerido com enzimas de restrição *Nde*I (5'CATATG3') e *Bam*HI (5'GGATCC3'), seguindo procedimento recomendado pelo fabricante (New England Biolabs).

3.8. AMPLIFICAÇÃO E MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA REGIÃO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA

Para a amplificação da região correspondente ao domínio N-terminal da proteína selvagem e para a obtenção de mutantes por mutagêneses sítio-dirigidos, foi necessário construir primers específicos. Os “primers” HsnifA1, HsnifA3A, PET5’ e PET3’ foram sintetizados no laboratório de Fixação de Nitrogênio da UFPR, os “primers” mutagênicos MUTV40E-R e MUTV138E-U foram produzidos pela Invitrogen Inc.

- HsnifA1 (alinha com a extremidade 5’ da seqüência do domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae*) → 5’ - TAGGGATCCCATATGGCCACT - 3’
- HsnifA3A (alinha com a extremidade 3’ da seqüência do domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae*) → 3’ - GAGCTATTGACTCCTAGGTA - 5’

Em azul está destacado o sítio de restrição para a endonuclease *Bam*HI e em vermelho, para a endonuclease *Nde*I. A presença destes sítios de restrição permite a clonagem posterior destes fragmentos de DNA.

- PET-5’ (alinha com a seqüência do promotor T7 do vetor pET-28a)
→ 5’ - TTAATACGACTCACTATAGG – 3’
- PET-3’ (alinha com a seqüência do terminador T7 do vetor pET-28a)
→ 3’ - GTGGCGACTCGTTATTGATCG – 5’
- MUTV40E-R (alinha com a extremidade 5’ da seqüência do domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae*, causando uma mudança no aminoácido valina por ácido glutâmico na posição 40, sublinhado na seqüência (5’-GGCGGAGAGCTCGTTGAGG-3’)) (SCHMIDT, 2003).
- MUTV138E-U (alinha com a extremidade 3’ da seqüência do domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae*, causando uma mudança no aminoácido valina por ácido glutâmico na posição 138, sublinhado na seqüência (5’-AATGCTGGGTGAGTTGTGCG-3’)) (SCHMIDT, 2003).

As temperaturas de fusão dos “primers” foram determinadas através do cálculo: $T (^{\circ}\text{C}) = X - Y$, onde

$X (^{\circ}\text{C}) = 2(\sum n^{\circ} \text{ de adeninas} + \sum n^{\circ} \text{ de timinas}) + 4(\sum n^{\circ} \text{ de guaninas} + \sum n^{\circ} \text{ de citocinas})$ e

$Y (^{\circ}\text{C}) = n^{\circ} \text{ de bases trocadas (que não pareiam com a seqüência original)} \times -5^{\circ}\text{C}$.

Para a amplificação e clonagem do domínio N-terminal selvagem, foi realizada uma reação de amplificação do DNA pela polimerase (PCR), usando como molde o plasmídeo pEMS130 e os “primers” HsnifA1 e HsnifA3A. A reação foi conduzida no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) seguindo o seguinte programa de ciclos: 94°C 2 minutos uma vez; 94°C 1 minuto, 50°C 1,5 minuto e 72°C 3 minutos vinte e cinco vezes; e 94°C 45 segundos, 50°C 1 minuto e 72°C 5 minutos uma vez. O fragmento de DNA resultante desta reação foi purificado em eletroforese em gel de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point” – LMP). Após a extração do gel e purificação, o DNA obtido foi analisado quanto à pureza e quantidade para posterior clonagem.

A fim de se obter a seqüência correspondente ao N-terminal NifA mutada, a estratégia de mutagênese sítio-dirigida foi utilizada para substituir aminoácidos específicos. Foram realizadas duas reações de PCR. A primeira foi feita para a construção de “megaprimers” (ANGELACCIO *et. al.*, 2002) sendo usado como molde o plasmídeo pEMS130 e os pares de “primers” MUTV40E-R e HsnifA1 ou MUTV138E-U e HsnifA3A.

As reações foram conduzidas no termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem), seguindo o seguinte programa de ciclos: 94°C 2 minutos uma vez; 94°C 1 minuto, 50°C 1,5 minutos e 72°C 3 minutos vinte e cinco vezes; e 94°C 45 segundos, 50°C 1 minuto e 72°C 5 minutos uma vez. Na segunda reação foram utilizados os produtos da primeira amplificação e os “primers” HsnifA1 ou HsnifA3A. As reações foram conduzidas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, seguindo o seguinte programa de ciclos: 96°C 10 minutos; 30°C 2 minutos e 72°C uma vez; 95°C 1,5 minutos, 30°C 1,5 minutos

e 72°C 1,5 minutos trinta e cinco vezes; e 72°C 10 minutos. Os fragmentos de DNA resultantes da primeira e da segunda reação foram purificados em eletroforese em gel de baixo ponto de fusão. Após a extração do gel e purificação, o DNA obtido foi analisado quanto à pureza e quantidade para uma posterior clonagem.

3.9. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DO DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). A visualização do DNA foi feita em um transluminador de luz ultravioleta após tratamento do gel com solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL) e o perfil eletroforético foi registrado através de um sistema de vídeo documentação (UVP-GDS 5000).

3.10. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO

As bandas DNA de interesse foram purificadas para posterior subclonagem conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) ou utilizando Kit de purificação de gel S.N.A.P.TM UV-FREE, da Invitrogen Inc. Este procedimento foi utilizado para a purificação de “megaprimers” e do domínio N-terminal NifA com a mutação inserida.

3.11. SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS

3.11.1. Desfosforilação do vetor

A desfosforilação dos vetores foi realizada utilizando-se 1 unidade de fosfatase alcalina de camarão (SAP) (Amersham Biosciences) em um sistema de 20µL que continha o plasmídeo previamente clivado com enzimas de restrição e o tampão específico para a enzima SAP. A mistura foi incubada por 1 hora e meia a

37°C e a fosfatase alcalina foi posteriormente inativada por aquecimento a 65°C por 15 minutos.

3.13.2. Ligação do fragmento de DNA ao vetor

Os fragmentos de DNA digeridos com enzimas de restrição foram ligados ao vetor pET-28a, na proporção 10:1 (fragmento:vetor), na presença de tampão T4 e DNA ligase 1x e 0,5 U da enzima T4 DNA ligase. A mistura de ligação foi transformada em células de *E. coli* XL1Blue.

3.14. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

Células eletrocompetentes foram obtidas conforme protocolo para Cell-Porator Electroporation System (Bethesda Research Tech, INC.), subdivididas em alíquotas de 20 µL e mantidas a -70°C. Para transformação bacteriana 1µL da mistura da ligação foi misturado com 20µL da suspensão de células eletrocompetentes e mantido em gelo por 1 minuto. Essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BRL) e submetidas a um campo elétrico (4KΩ, 330µF). Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1mL de meio SOC e incubadas a 37° C, sob agitação por 1 hora. Ao término da incubação, alíquotas da suspensão foram semeadas em placas de Petri contendo meio LA com os antibióticos adequados e incubadas a 37°C. As colônias foram coletas e analisadas para presença de plasmídeos recombinantes.

3.15 SEQUENCIAMENTO DO DNA

Fragmentos de DNA clonados nos vetores pET28a foram seqüenciados. A reação de sequenciamento foi baseada no método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977), onde dideoxynucleotídeos foram utilizados como terminadores de cadeia. O DNA foi sequenciado em Sequenciador Automático ABI377 Prism (Perkin Elmer).

3.15.1.Preparo do material para sequenciamento

A extração dos plasmídeos foi realizada de acordo com item 3.5 (preparação de plasmídeos em pequena escala). À solução de plasmídeos obtida foram adicionadas 0,5- μ L de RNase (5mg/mL) e a mistura foi incubada a 37° C por 2 horas. Terminado o tempo, foi efetuada mais uma extração com 100 μ L de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Em seguida o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto por 30 minutos no gelo, centrifugado, e o precipitado lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 8 μ L de H₂O ultrapura. A qualidade do DNA foi verificada através de eletroforese em agarose, a pureza e a concentração do DNA foi determinada pela absorbância a 260 e 280 nm.

3.15.2.Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento continha de 100 a 500ng do DNA purificado, 4 μ L de mistura para sequenciamento (tampão com Terminator Ready Rxn Mix-Perkin Elmer e DNA polimerase), 10 pmol do “primer” reverso ou universal e H₂O estéril para o volume final de 10 μ L. A solução foi submetida a uma reação de seqüenciamento no termociclador com o seguinte programa: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 20 segundos a 96°C e 1 minuto e 30 segundos a 60°C. O produto da reação de sequenciamento foi transferido para um tubo tipo Eppendorf de 500 μ L, sendo então acrescentados 10 μ L de água e 20 μ L de isopropanol. Essa mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm, o precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 15 μ L de tampão TSR (Perkin Elmer). O material foi aplicado em gel de poliacrilamida desnaturante com uréia e analisado em Sequenciador Automático de DNA.

3.15.3. Análise das seqüências de DNA

A análise de comparação das seqüências obtidas após o sequenciamento foi feita utilizando o programa BLAST (GeneBank/NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) ou Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1997).

4. Resultados e Discussão

O processo de fixação de nitrogênio é altamente dispendioso do ponto de vista energético [para a redução de 1 mol de N_2 a 2 mols de NH_4^+ são gastos aproximadamente 32 mols de ATP (POSTAGATE, 1982) e portanto precisa ser altamente controlado. Tal mecanismo de controle exige a participação de proteínas específicas, dentre elas a proteína NifA. Esta proteína é expressa pelo gene *nifA* e é responsável pela ativação transcricional para a expressão dos demais genes *nif*.

A estrutura da proteína NifA compreende 3 domínios característicos: o domínio C-terminal que possui um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado envolvido na ligação ao DNA; o domínio central que possui um motivo característico de ligação ao ATP, provavelmente envolvido na interação com a subunidade σ^N da RNA polimerase e com a formação do complexo aberto. Este é o domínio catalítico da proteína NifA (LEE *et al.*, 1993) e o domínio N-terminal que apresenta o menor grau de conservação da seqüência de aminoácidos entre as proteínas NifA e sua função ainda não foi claramente estabelecida (FISCHER, 1994), embora dados recentes indiquem estar relacionado à regulação por amônio (ARSENE *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1999). Esta proteína apresenta características comuns a muitos ativadores transcricionais que regulam a expressão de genes em conjunto com a RNA polimerase σ^N . A primeira estrutura para esse ativador transcricional foi proposta para a proteína NifA de *K. pneumoniae* (FISCHER, 1994).

A sensibilidade à amônia é uma função atribuída ao domínio N-terminal, uma vez que a NifA sem esse domínio ativa a transcrição dos genes *nif* e não é inibida pela presença de amônia, mas somente de oxigênio (MONTEIRO *et al.*, 1999 a e b; SOUZA *et al.*, 1999).

Embora o grau de similaridade entre os domínios N-terminal de diferentes diazotrofos seja baixo, estudos de mutagênese já realizados podem servir como base para estudos semelhantes em *H. seropedicae*. Como comentado anteriormente, em *A. brasilense*, uma única mutação na posição 18 do domínio N-

terminal da NifA, onde um resíduo de tirosina foi trocado por um de fenilalanina, foi suficiente para permitir o escape do controle de PII mas não do controle de amônia (ARSENE *et al.*, 1999). Já em *R. capsulatus*, tanto uma troca do aminoácido leucina por glutamina na posição 66, como a troca de valina por glutamato na posição 42 do domínio N-terminal da NifA, resultou em mutantes com atividade de NifA tolerante a amônio (PASCHEN *et al.*, 2001). Em vista dos resultados obtidos com esses dois microrganismos, as seqüências de aminoácidos do domínio N-terminal de *A. brasilense* e *R. capsulatus* foram comparadas com a seqüência de aminoácidos do domínio N-terminal de *H. seropedicae*, através do programa ClustalW (figura 2).

Apesar do baixo grau de identidade entre as seqüências de aminoácidos dos domínios N-terminal (apenas 14,22%) de *R. capsulatus*, *A. brasilense* e *H. seropedicae*, na análise dos alinhamentos observou-se que os resíduos de aminoácidos valina na posição 40 e na posição 138 estão conservados. Além desses dois resíduos, outros apresentam algum grau de conservação. Geralmente aminoácidos envolvidos em interações intra ou intermoleculares são conservados entre diferentes espécies. Os resultados obtidos nesse alinhamento foram utilizados para direcionar os experimentos de mutagênese sitio-dirigida.

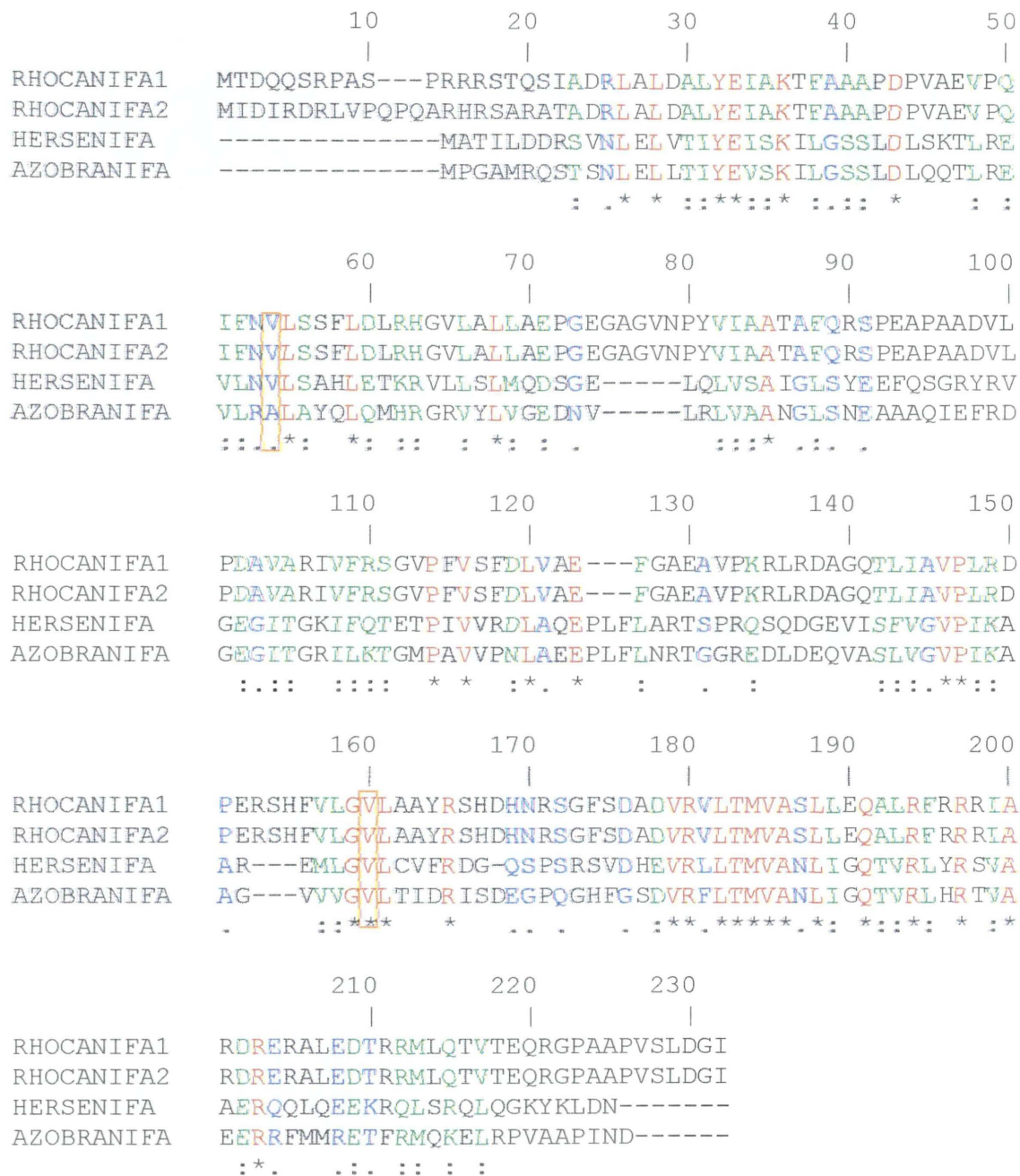


Figura 2 – Comparação da seqüência de aminoácidos do domínio N-Terminal das proteínas Nifa de *A. brasilense* (AZOBRANIFA), *R. capsulatus* (RHOCANIFA1 e RHOCANIFA2) E *H. seropedicae* (HERSENIFA).

Em vermelho estão os aminoácidos idênticos (14.2%), verde os aminoácidos de alta similaridade (22.4%), azul os aminoácidos de baixa similaridade (9.5%) e no retângulo os aminoácidos selecionados para a mutagênese sítio dirigida.

O alinhamento foi feito pelo programa ClustalW.

4.1 Clonagem do domínio N-terminal da proteína NifA

Com a finalidade de se obter um controle para os experimentos fisiológicos que deverão ser realizadas após a seleção e confirmação dos mutantes, foi necessário a clonagem do domínio N-terminal da proteína NifA selvagem de *H. seropedicae* em vetor de expressão.

A seqüência de nucleotídeos correspondente ao domínio N-terminal da proteína NifA foi amplificada com os “primers” HsnifA1 e HsnifA3A utilizando como molde o plasmídeo pEMS130 (Souza *et al.*, 1991b). O fragmento obtido apresentou aproximadamente 600 pares de bases (figura 3) e foi então purificado (item 3.12). Posteriormente este fragmento foi clivado com as enzimas *NdeI* e *BamHI* (item 3.7), cujos sítios foram inseridos pelos “primers” HsnifA1 e HsnifA3A respectivamente.

Para a clonagem dos amplificadores em vetor de expressão, plasmídeo pET28a (mapa em anexo1) foi purificado de *E. coli* estirpe DH10B pelo método de lise alcalina (item 3.5) e posteriormente clivado com as enzimas *NdeI* e *BamHI* (item 3.7). As pontas coesivas dos produtos de clivagem (fragmento correspondente ao domínio N-terminal de *H. seropedicae* e pET28a) foram ligadas (item 3.13.2) e a mistura de ligação transformada em células de *E. coli* XL1Blue (item 3.14). Colônias transformantes foram recuperadas em meio SOC e posteriormente plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos correspondentes (Tc¹⁰ p/ XL1blue e Km⁵⁰ p/ pET28a). Vinte e oito colônias coletadas neste meio foram incubadas em meio líquido LB e tiveram seus plasmídeos extraídos por lise alcalina (item 3.5). Os prováveis clones foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (figura 4). Um clone foi selecionado e a presença do inserto de aproximadamente 600pb, foi confirmada após clivagem do plasmídeo com as enzimas *NdeI* e *BamHI* (figura 5 e 6). Este clone foi denominado pLET.

O fragmento correspondente ao domínio N-terminal de *H. seropedicae* inserido no vetor pET28a foi seqüenciado com os “primers” PET 5' e PET3' e verificou-se que durante os processos de ampliações que precederam esta ligação não ocorreu alteração da seqüência original de nucleotídeos (Figura 7).

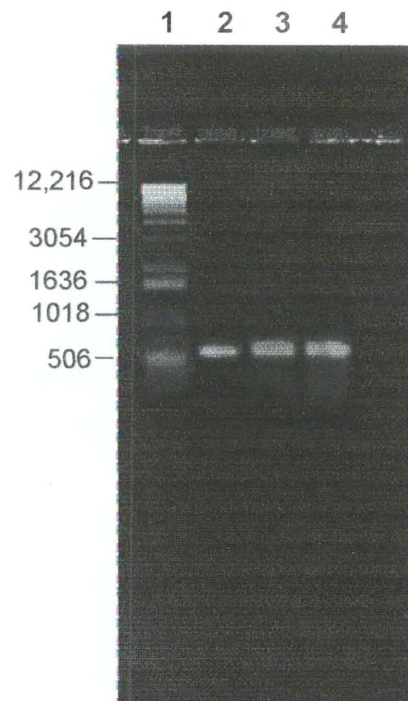


Figura 3 Padrão eletroforético de fragmentos de DNA, obtidos por amplificação, contendo o domínio N-terminal da NifA de *H.seropedicae*.

Poço1: padrão 1kb ladder; poço 2: N-terminal selvagem; poço 3: N-terminal mutado com o primer MUTV40E-U e poço 4: N-terminal com o primer MUTV138V-U.

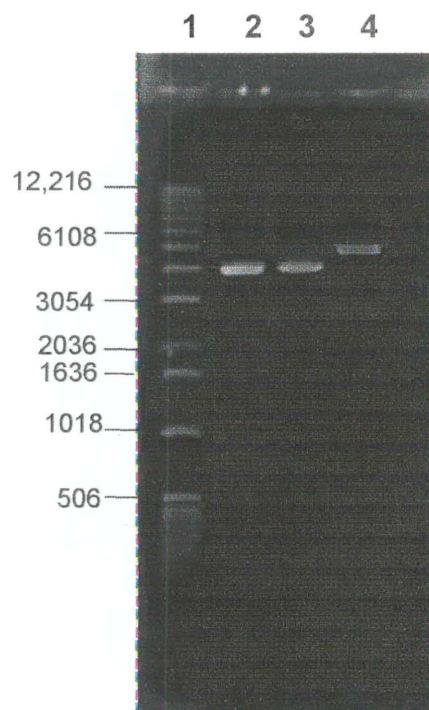


Figura 4. Padrão eletroforético dos plasmídeos transformados *E. coli* XL1Blue.

Poço 1: padrão 1Kb ladder, poço 2: vetor pET28a (controle); poço 3: clone sem a inserção do fragmento de 600pb e poço 4: clone com a inserção do domínio N-terminal da Nifa de *H. seropedicae*.

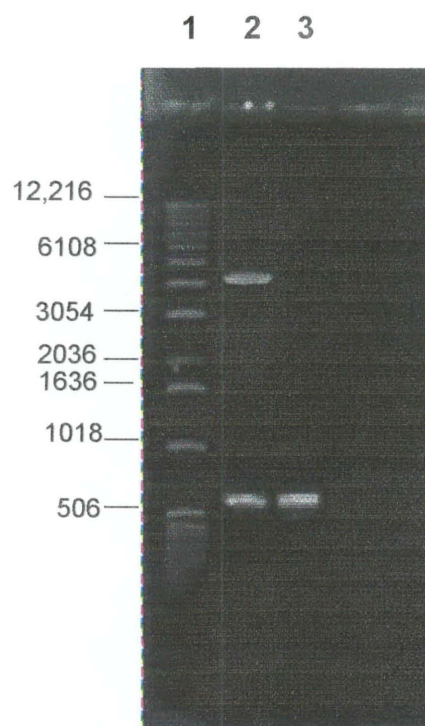


Figura 5. Padrão eletroforético do plasmídeo recombinante contendo o domínio N-terminal de *H. seropedicae*.

Poço 1: padrão 1 Kb ladder; poço 2: clone contendo o domínio N-terminal de *H. seropedicae* após clivagem com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, que resultou na liberação deste domínio e poço 3: domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae* utilizado como padrão.

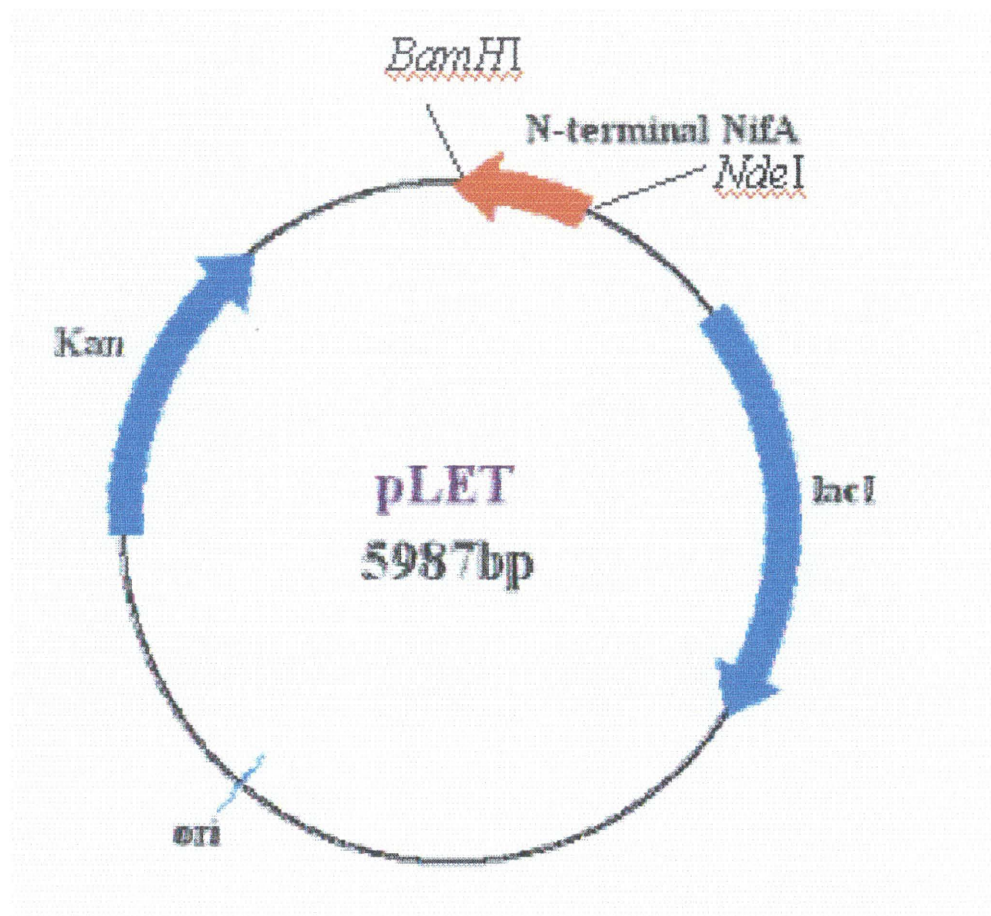


Figura 6. Mapa do plasmídeo pLET.

Este plasmídeo é resultado da fusão do plasmídeo pET28a e do domínio N-terminal da NifA. O mapa mostra a origem de replicação do pBR322 (*ori*), o gene *lacI*, o gene de resistência a canamicina (*Kan*) e a seqüência de nucleotídeos do domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae* mostrada em vermelho.

```

1                                     60
atg gcc act att ctc gac gac cgc agt gtg aat tta gaa ctc gta acg att tac gag atc
M A T I L D D R S V N L E L V T I Y E I

61                                     120
agc aag ata ttg ggt tca tcg ctg gat cta tcc aag acc ttg cgc gaa gtc ctc aac gtc
S K I L G S S L D L S K T L R E V L N V

121                                    180
ctc tcc gcc cac ctg gaa acg aaa cgg gta ttg ctg agt ctg atg cag gac tcc ggt gaa
L S A H L E T K R V L L S L M Q D S G E

181                                    240
ttg caa ctg gtc agc gcc atc ggc ctg agt tac gaa gaa ttc cag agt ggc aga tac cgg
L Q L V S A I G L S Y E E F Q S G R Y R

241                                    300
gtc ggc gag ggc atc acc ggc aag atc ttc cag acg gaa act ccc atc gtg gtg cgc gac
V G E G I T G K I F Q T E T P I V V R D

301                                    360
ttg gcc cag gag ccg ctg ttc ctg gct cgc acc agc ccg cgc cag tcg caa gac ggg gaa
L A Q E P L F L A R T S P R Q S Q D G E

361                                    420
gtc att tcc ttt gtg ggc gtg ccg atc aag gct gcc cgt gaa atg ctg ggt gtg ttg tgc
V I S F V G V P I K A A R E M L G V L C

421                                    480
gtt ttt cgg gat gga caa tcg ccc tcg cgt agt gtc gac cat gag gtg cgc ctg ctg acc
V F R D G Q S P S R S V D H E V R L L T

481                                    540
atg gtg gcc aac ctg atc gga caa acc gtc cgg ctg tat cgc agc gta gcg gcc gag cgc
M V A N L I G Q T V R L Y R S V A A E R

541                                    600
cag cag ctg caa gag gaa aag cgc cag ctg tcc cgg caa ctc cag ggc aag tac aag ctc
Q Q L Q E E K R Q L S R Q L Q G K Y K L

601
gat aac
D N

```

Figura 7. Seqüência de nucleotídeos do domínio N-terminal NifA de *H. seropedicae* no pLET.

Esta seqüência foi obtida após amplificação e clonagem do fragmento contendo o domínio N-terminal da proteína NifA, no vetor pET 28a.

Os aminoácidos correspondentes de cada códon estão em vermelho.

4.2 MUTAGENESE SÍTIO DIRIGIDA

A partir da comparação das seqüências de aminoácidos dos domínios N-terminal das proteínas NifA de *A. brasilense*, *R. capsulatus* e *H. seropedicae* (Figura 3), foram selecionados como alvos para os estudos de mutagênese em *H. seropedicae* os resíduos de valina na posição 40 e 138.

A substituição de valina na posição 40 (“primer” MUTV40E-R) foi selecionado por estar numa região mais conservada, em relação à região que alinha com o resíduo de valina na posição 42 da seqüência de aminoácidos da NifA1 de *R. capsulatus* onde tal mudança resultou em mutantes com atividade de NifA tolerante a amônio (PASCHEN *et al.*, 2001). A substituição do aminoácido valina da posição 138 (MUTV138E-U) também foi selecionada por estar numa região com alto grau de conservação. O estudo desses resíduos pode fornecer resultados importantes para a caracterização funcional do domínio N-terminal da NifA em *H. seropedicae*.

No quadro 4 são mostrados os resíduos observados na seqüência selvagem, as mutações sugeridas e os “primers” mutagênicos desenhados.

Quadro 4. Códon e resíduos de aminoácidos substituídos pelos “primers” mutagênicos.

Resíduo	Códon	Substituído por	Códon	Primer mutagênico
Valina 40	GTC	Ac. glutâmico	GAG	MUTV40E-R 5'GGCGGAGAGCTCGTTGAGG3'
Valina 138	GTG	Ac. glutâmico	GAG	MUTV138E-U 5'AATGCTGGTGAGTTGTGCG3'

Legenda: * As bases que foram trocadas estão representadas em vermelho escuro e o códon modificado em vermelho. ** O sítio de restrição para a endonuclease Sac I inseridos no “primer” MUTV40E-R está destacado em itálico.

O “primer” MUTV40E-R (Schmidt, 2003) apresenta 19 nucleotídeos e foi desenhado para efetuar a troca da valina na posição 40 por um ácido glutâmico,

pela troca do códon GTC por GAG. Com essa modificação também foi criado um sítio para a enzima *SacI* que possibilita diferenciar por análise de restrição a seqüência mutante da seqüência selvagem que não apresenta este sítio. O “primer” MUTV138E-U (Schmidt, 2003) apresenta 19 nucleotídeos e a troca do códon GTG por GAG, modificando a valina na posição 138 para um ácido glutâmico.

4.2.1 Estratégia de mutagênese sítio dirigida

O plasmídeo pEMS130 que contém a seqüência codificadora da proteína NifA de *H. seropedicae*, clonado no vetor pTZ18-R (Souza *et al*, 1999) foi utilizado como molde para as reações de mutagênese sítio-dirigida. Na primeira reação se utilizou os primers HsnifA1 e MUTV40E-R ou MUTV138E-U e HsnifA3A, para a obtenção de “megaprimers” (Figura 8) com os devidos códons alterados. Na segunda reação se utilizou o produto da primeira amplificação mais os “primers” HsnifA3A ou HsnifA1 respectivamente para a obtenção da seqüência codificadora do domínio N-terminal NifA de *H. seropedicae* com a mutação inserida.

Para a obtenção da seqüência do domínio N-terminal NifA com a mudança do códon correspondente à valina na posição 40 por ácido glutâmico (figura 9), foi utilizado os “primers” HsnifA1 e MUTV40E-R, que resultou em um fragmento de DNA NifAMUTV40E que apresenta aproximadamente 130pb. Este foi então purificado por gel de agarose de baixo ponto de fusão (item 3.12) e posteriormente utilizado como “megaprimer” em uma reação de amplificação juntamente com o “primer” HsnifA3A, resultando no domínio N-terminal, que apresenta aproximadamente 600 pb, com a mutação desejada inserida (figuras 2 e 10). Este domínio foi também purificado em gel de agarose de baixo ponto de fusão.

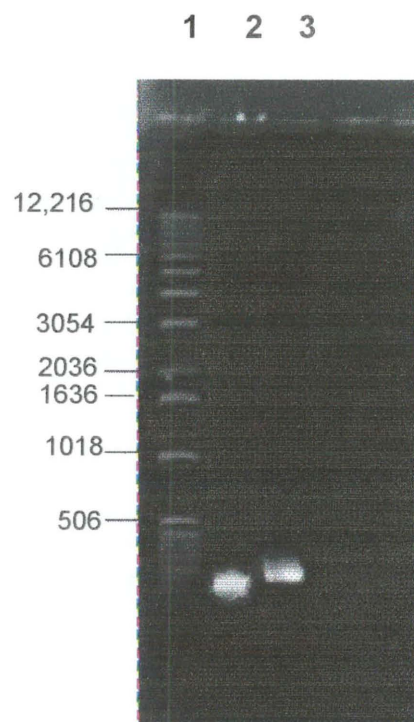


Figura 8. Padrão eletroforético dos “megaprimers”.

Poço 1: padrão 1Kb ladder; poço 2: “megaprimers” NifAMUTV40E (130pb) e poço 3: “megaprimers” NifAMUTV138E (205 pb).

```

1                                     60
atg gcc act att ctc gac gac cgc agt gtg aat tta gaa ctc gta acg att tac gag atc
M A T I L D D R S V N L E L V T I Y E I

61                                     120
agc aag ata ttg ggt tca tcg ctg gat cta tcc aag acc ttg cgc gaa gtc ctc aac gag
S K I L G S S L D L S K T L R E V L N E

121                                     180
ctc tcc gcc cac ctg gaa acg aaa cgg gta ttg ctg agt ctg atg cag gac tcc ggt gaa
L S A H L E T K R V L L S L M Q D S G E

181                                     240
ttg caa ctg gtc agc gcc atc ggc ctg agt tac gaa gaa ttc cag agt ggc aga tac cgg
L Q L V S A I G L S Y E E F Q S G R Y R

241                                     300
gtc ggc gag ggc atc acc ggc aag atc ttc cag acg gaa act ccc atc gtg gtg cgc gac
V G E G I T G K I F Q T E T P I V V R D

301                                     360
ttg gcc cag gag ccg ctg ttc ctg gct cgc acc agc ccg cgc cag tcg caa gac ggg gaa
L A Q E P L F L A R T S P R Q S Q D G E

361                                     420
gtc att tcc ttt gtg ggc gtg ccg atc aag gct gcc cgt gaa atg ctg ggt gtg ttg tgc
V I S F V G V P I K A A R E M L G V L C

421                                     480
gtt ttt cgg gat gga caa tcg ccc tcg cgt agt gtc gac cat gag gtg cgc ctg ctg acc
V F R D G Q S P S R S V D H E V R L L T

481                                     540
atg gtg gcc aac ctg atc gga caa acc gtc cgg ctg tat cgc agc gta gcg gcc gag cgc
M V A N L I G Q T V R L Y R S V A A E R

541                                     600
cag cag ctg caa gag gaa aag cgc cag ctg tcc cgg caa ctc cag ggc aag tac aag ctc
Q Q L Q E E K R Q L S R Q L Q G K Y K L

601
gat aac
D N

```

Figura 9. Sequência de nucleotídeos do domínio N-terminal NifA de *H. seropedicae* contendo a mutação da valina na posição 40 usando o “primer” MUTV40E-R.

O códon modificado está marcado em verde e o aminoácido modificado em azul.

Os aminoácidos correspondentes de cada códon estão em vermelho.

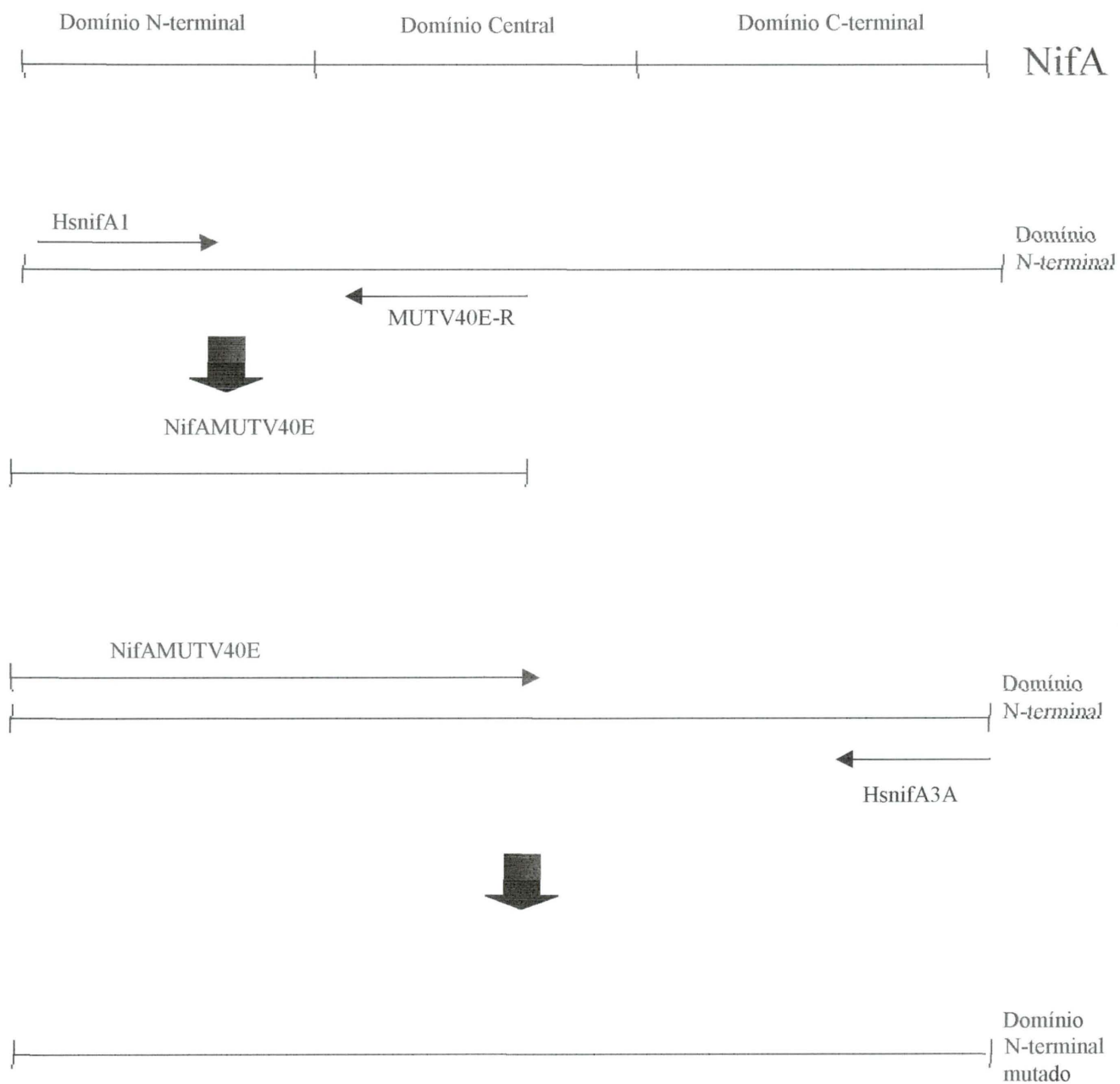


Figura 10. Esquema ilustrativo da estratégia de mutagênese sítio dirigida utilizando o “primer” mutagênico MUTV40E-R.

O plasmídeo pEMS130 (SOUZA et al.1991b) foi utilizado como DNA molde.

Para a obtenção da seqüência do domínio N-terminal NifA com a mudança do códon correspondente à valina na posição 138 por ácido glutâmico (figura 11), foram utilizados os “primers” HsnifA3A e MUTV138E-U. A amplificação resultou em um fragmento de DNA, NifAMUTV138E, que apresenta aproximadamente 205pb (figura 8). Este foi purificado por gel de agarose de baixo ponto de fusão (item 3.12) e posteriormente utilizado como “megaprimer” em uma reação de amplificação juntamente com o primer HsnifA1, resultando no domínio N-terminal, que apresenta aproximadamente 600 pb, com a mutação desejada inserida (figuras 2 e 12). Este fragmento foi então purificado em gel de agarose de baixo ponto de fusão.

Os domínios N-terminais contendo as mutações após serem purificados foram clivados com *NdeI* e *BamHI*, e deverão ser clonados no vetor de expressão pET28a, seguindo a metodologia aplicada neste trabalho para a clonagem do domínio N-terminal NifA não mutado. Com a obtenção destes clones será possível super expressar as proteínas correspondentes (selvagem e mutadas) e purificá-las em colunas cromatográficas para realização de ensaios fisiológicos e bioquímicos.

```

1                                                                                               60
atg gcc act att ctc gac gac cgc agt gtg aat tta gaa ctc gta acg att tac gag atc
M A T I L D D R S V N L E L V T I Y E I

61                                                                                               120
agc aag ata ttg ggt tca tcg ctg gat cta tcc aag acc ttg cgc gaa gtc ctc aac gtc
S K I L G S S L D L S K T L R E V L N V

121                                                                                              180
ctc tcc gcc cac ctg gaa acg aaa cgg gta ttg ctg agt ctg atg cag gac tcc ggt gaa
L S A H L E T K R V L L S L M Q D S G E

181                                                                                              240
ttg caa ctg gtc agc gcc atc ggc ctg agt tac gaa gaa ttc cag agt ggc aga tac cgg
L Q L V S A I G L S Y E E F Q S G R Y R

241                                                                                              300
gtc ggc gag ggc atc acc ggc aag atc ttc cag acg gaa act ccc atc gtg gtg cgc gac
V G E G I T G K I F Q T E T P I V V R D

301                                                                                              360
ttg gcc cag gag ccg ctg ttc ctg gct cgc acc agc ccg cgc cag tcg caa gac ggg gaa
L A Q E P L F L A R T S P R Q S Q D G E

361                                                                                              420
gtc att tcc ttt gtg ggc gtg ccg atc aag gct gcc cgt gaa atg ctg ggt gag ttg tgc
V I S F V G V P I K A A R E M L G E L C

421                                                                                              480
gtt ttt cgg gat gga caa tcg ccc tcg cgt agt gtc gac cat gag gtg cgc ctg ctg acc
V F R D G Q S P S R S V D H E V R L L T

481                                                                                              540
atg gtg gcc aac ctg atc gga caa acc gtc cgg ctg tat cgc agc gta gcg gcc gag cgc
M V A N L I G Q T V R L Y R S V A A E R

541                                                                                              600
cag cag ctg caa gag gaa aag cgc cag ctg tcc cgg caa ctc cag ggc aag tac aag ctc
Q Q L Q E E K R Q L S R Q L Q G K Y K L

601
gat aac
D N

```

Figura 11. Seqüência de nucleotídeos do domínio N-terminal NifA de *H. seropedicae* mutado com o “primer” MUTV138E-U.

Os aminoácidos correspondentes de cada códon estão em vermelho.

O códon modificado está marcado em verde e o aminoácido modificado em azul.

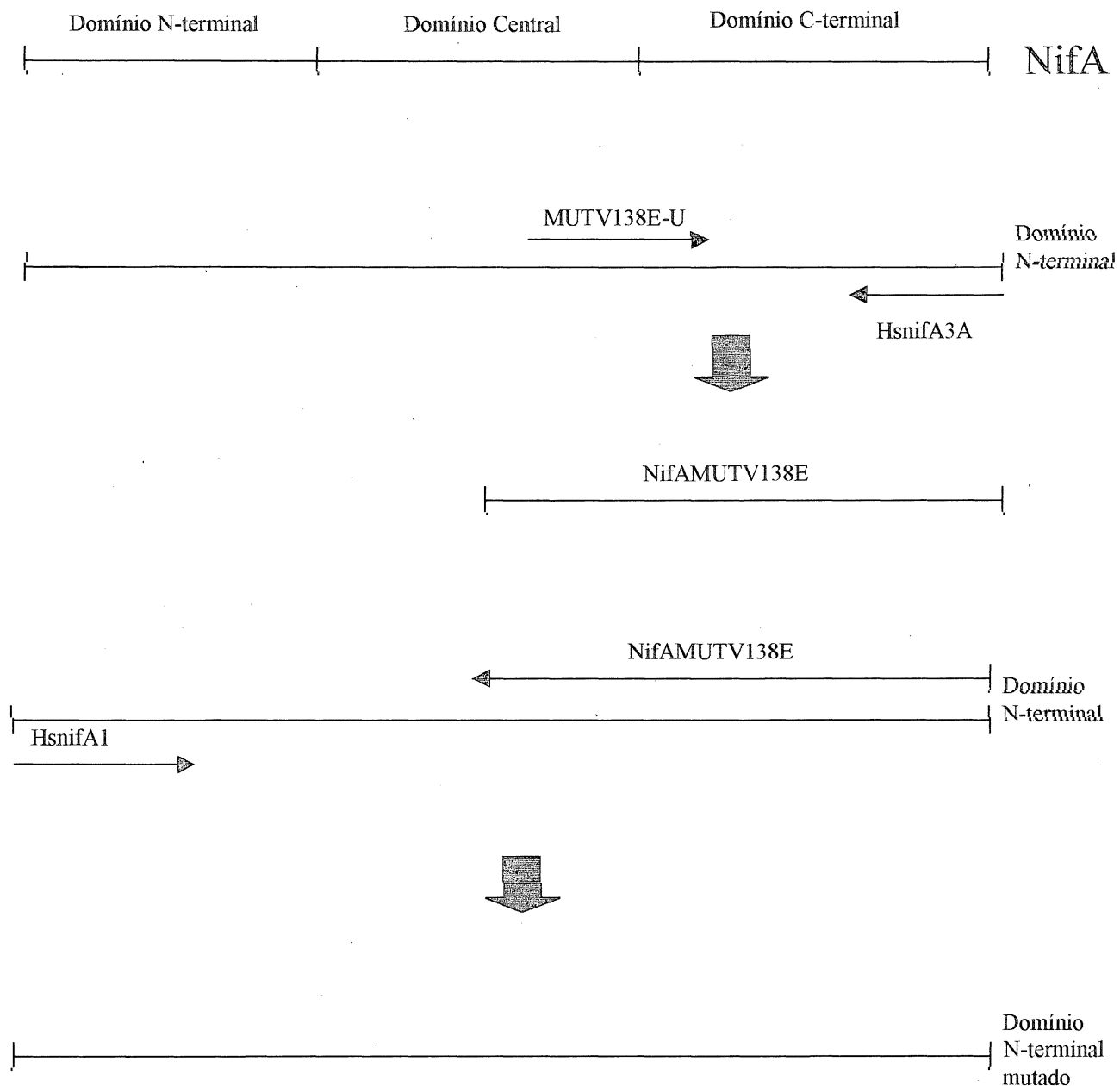


Figura 12. Esquema ilustrativo da estratégia de mutagênese sítio dirigida utilizando o "primer" mutagênico MUTV138E-R e como DNA molde o plasmídeo pEMS130 (SOUZA et al.1991b).

5. Conclusão

Neste trabalho foram realizadas mutagênese sítio-dirigida do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. Seropedicae*, a fim de contribuir para sua caracterização funcional.

Foram obtidas as seqüências correspondentes ao domínio N-terminal com as mutações nas valinas, posição 40 e 138, por ácidos glutâmicos.

Foi também obtido um clone em vetor de expressão contendo o domínio N-terminal selvagem que será usado como controle nos experimentos fisiológicos.

6. Perspectivas

As seqüências mutadas do domínio N-terminal da proteína NifA já obtidas estão sendo subclonadas no vetor pET28a e pTZ18-R, para que possam ser realizados ensaios de expressão de proteínas e análise do comportamento fisiológico dos diferentes mutantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANGELACCIO, S.; di PATTY, M. C. B. Site Directed Mutagenesis by the Megaprimer PCR Method: Variations on a Theme for Simultaneous Introduction of Multiple Mutations. *A. Biochemistry.*, 306, 346-349, 2002.

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

ARSENE, F.; KAMINSKI, 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.*, v.178, p. 4830-4838, 1996.

ARSENE, F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect fo replacing Tyr residues fo the NifA N-terminal domain on NifA activity. *FEMS Microbiol. Lett.* V. 179, p. 339-343, 1999.

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. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

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.

BERGER, D. K.; NARBERHAUS, F.; LEE, H. S.; KUSTU, S. In vitro studies of the domains of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. *J. Bacteriol.* v. 177, p.191-199, 1995.

DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. *Symbiosis*, Rehovot, v. 13, p. 1-13, 1992.

FADEL-PICHETH, C.M.T.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 179, p. 281-288, 1999.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 58, p. 352-375, 1994.

GALVÃO, C.W.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. ; STEFFENS, M.B.R. Evidence for a *recX*-like gene in the nitrogen fixing bacteria *Herbaspirillum seropedicae*. In : XXVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1998: Caxambu). Resumos... Caxambu: 1998. p.46.

GRANT, S.G.N.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation- restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Washington, v. 87, p. 4645-4649, 1990.

GREEN, J.; BENNETT, B.; JORDAN, P.; RALPH, E.T.; THOMSON, A.J.; GUEST, J.R. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. *Biochem. J.*, v.316, p.887-892, 1996.

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.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen fixation genes via redox-sensitive switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93, p. 2143-2148, 1996.

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.

KLASSEN, G. Análise genética e funcional dos genes *nifENXorf1orf2*, *nifQmodABCfixXC* de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2000. Tese (Doutorado em Ciências- Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. ; YATES, M.G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.118, p.165-170, 1999.

LEE, H. S.; BERGER, D. K.; KUSTU, S. Activity of purified NifA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes. *Proc. Natl. Sci. USA.*, v. 90, p. 2266-2270, 1993.

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.* v.5, p. 2735-2744, 1991.

LIANG, Y.Y.; ZAMAROCZY, M.; ARSENE, F.; PASQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.100, p.113-120, 1992.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct interaction of NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p.15472-15481, 2002.

MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 29, n.12, p.1599-1602, 1996.

MASEPHOL, B.; KLIPP, W.; PÜHLER, A. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.*, v. 212, p. 27-37, 1988.

MERRICK, M. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. *Biological Nitrogen Fixation*. 1 ed., New York: Chapman & Hall, 1992.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* v. 59, p. 604-622, 1995.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of a N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEBS Lett.* V. 447, p. 283-286, 1999a.

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 Microbiol. Lett.* V. 180, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E. M.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEBS Lett.* V. 508, p. 1-4, 2001a.

MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; CHUBATSU, L. S. Isolation of Recombinant Plasmids for Rapid Analysis Using a Sodium Dodecyl Sulfate/Potassium Chloride Precipitation. *Analytical Biochemistry*. Vol. 292, p. 169-170, 2001b.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Fnr is involved in oxygen control of *Herbaspirillum seropedicae* N-truncated NifA protein activity in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiol.*, v.69(3), 2003, *in press*.

NOINDORF, L.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L.U. ; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Evidence for a ammonium transporter gene (*AmtB*) in the nitrogen-fixing bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1999: Caxambu). *Resumos...* Caxambu, 1999.n. F-79.

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol.*, Cambridge, v. 135, p. 723-737, 1997.

PASCHEN, A; DREPPER, T.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. *Rhodobacter capsulatus* NifA mutants mediating *nif* gene expression in the presence of ammonium. *FEMS Microbiol. Lett.* V. 200, p. 207-213, 2001.

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Biotechnology*, v. 91, p. 189-195, 2001.

PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 192, p. 217-221, 2000.

POSTGATE, J. R. (1982). THE FUNDAMENTALS OF NITROGEN FIXATION. CAMBRIDGE, CAMBRIDGE UNIV. PRESS. P. 252.

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.

RONCATO-MACCARI, L.D.B., RAMOS, H.J.O., PEDROSA, F.O., ALQUINI, Y., CHUBATSU, L. S. YATES, M. G. RIGO, L. U. STEFFENS, M. B. R., SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* gene in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 45: 39-47, 2003.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil. Biol. Biochem.* V. 29, nº 5/6, p. 831-841, 1997.

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

SANGER, 1997 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHMITZ, R.A. NifL of *Klebsiella pneumoniae* carries an N-terminally bound FAD cofactor, which is not directly required for the inhibitory function of NifL. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.157, p. 313-318, 1997.

SCHMIDT, J. C. Mutagênese do domínio N-terminal da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2003. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SOARES-RAMOS J. R.L., RAMOS H.J.O., CRUZ L. M., CHUBATSU L S., PEDROSA F. O., RIGO L.U., SOUZA E. M. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. *Genetics and Molecular Biology*.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. 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.; 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.; 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.

STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S.; SOUZA, E. M.; MACHADO; H.B.; PEDROSA, F. O. Cloning of a *recA* like gene from the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v.39, p. 1096-1102, 1993

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.*, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

VOIGT, E. L. Identificação e análise estrutural de genes a montante do gene *nifA* em *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2000. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

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

