



PATRICIA SOTOMAIOR

CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA NifAQ1Ab DE
Azospirillum brasilense

CURITIBA

2009

PATRICIA SOTOMAIOR

**CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA NifAQ1Ab DE
*Azospirillum brasilense***

Monografia apresentada à matéria BQ016 – Estágio em Bioquímica como requisito parcial à conclusão do curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel M. de Souza.

Co-orientadora: Dr.^a Luíza Maria de Araújo

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha co-orientadora, professora Dr^a. Luíza Maria de Araújo, pela orientação, apoio, dedicação, confiança, interesse e amizade, sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao meu orientador, professor Dr. Emanuel M. de Souza, pela oportunidade de realizar este trabalho, orientação, sugestões e interesse.

À professora Dr^a. Rose Adele Monteiro pelo convite para trabalhar no grupo como Iniciação Científica, pelas sugestões, apoio, idéias e amizade.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio.

A todos os professores do Instituto de Fixação Biológica de Nitrogênio pelas sugestões, ajuda e conselhos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial a Roseli Prado, Valter de Baura e Dona Julieta, pela colaboração, disponibilidade e ajuda.

À professora Marina e ao colega Lucas pela ajuda durante os experimentos com MALDI.

Aos colegas dos laboratórios 271 e 272 pela amizade, carinho, colaboração, dedicação, força, conselhos, incentivo e ajuda demonstrados durante todo o meu trabalho no laboratório.

À minha família, em especial minha mãe e meu pai, pelo amor, confiança, ajuda e incentivo incondicionais.

Ao meu namorado Vinicius, pelo amor, compreensão e confiança dedicados.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e aos órgãos financiadores, CNPq e INCT – Fixação Biológica de Nitrogênio pelos auxílios prestados e apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | 6 |
| LISTA DE TABELAS | 9 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 10 |
| RESUMO | 12 |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO | 13 |
| 1.1.1 Complexo da nitrogenase..... | 14 |
| 1.2 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO | 14 |
| 1.3 GENES <i>nif</i> | 15 |
| 1.3.1 Regulação da expressão dos genes <i>nif</i> | 16 |
| 1.3.2 Regulação da expressão do gene <i>nifA</i> | 17 |
| 1.4 PROTEÍNA NifA | 18 |
| 1.5 CONTROLE DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA | 19 |
| 2 OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 21 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDIOS | 22 |
| 3.2 MEIOS DE CULTURA | 23 |
| 3.2.1 Meios empregados para o cultivo de <i>E. coli</i> | 23 |
| 3.2.2 Meio empregado para o cultivo de <i>A. brasilense</i> | 24 |
| 3.3 ANTIBIÓTICOS | 25 |
| 3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO | 26 |
| 3.5 ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS..... | 26 |
| 3.6 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE <i>Azospirillum brasilense</i> | 26 |
| 3.7 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR..... | 27 |
| 3.8 SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE DNA | 28 |
| 3.9 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS AO VETOR pCR2.1 | 28 |
| 3.10 DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E PREPARO DOS VETORES..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 3.11 LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR..... | 29 |
| 3.12 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO | 29 |
| 3.12.1 Preparo de bactérias eletrocompetentes para eletroporação | 29 |
| 3.12.2 Transformação bacteriana | 30 |
| 3.13 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL | 30 |
| 3.14 ANÁLISE DOS PLASMÍDIOS | 31 |
| 3.15 SEQUENCIAMENTO DO DNA..... | 31 |
| 3.16 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NifAQ1Ab EM <i>E. coli</i> | 32 |
| 3.17 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES..... | 32 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 34 |
| 4.1 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES CODIFICADORAS DOS DOMÍNIOS N- TERMINAL E CENTRAL + C-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE <i>Azospirillum</i> <i>brasilense</i> E <i>Azotobacter vinelandii</i> | 34 |
| 4.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDIOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQÜÊNCIAS CODIFICADORAS PARA OS DOMÍNIOS MODULARES DA PROTEÍNA NifA DE <i>A. brasilense</i> E <i>A. vinelandii</i> | 42 |
| 4.3 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS RECOMBINANTES CONTENDO OS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS NifAQ1Ab E NifAQ2Ab | 53 |
| 4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA NifAQ1Ab..... | 61 |
| 5 CONCLUSÕES | 67 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| APÊNDICE 1 | 74 |
| APÊNDICE 2..... | 75 |
| APÊNDICE 3..... | 76 |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – ESQUEMA DO ALINHAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS À SEQUÊNCIA CODIFICADORA DOS DOMÍNIOS MODULARES DA PROTEÍNA NifA DE *A. brasilense* E *A. vinelandii*
..... 37
- FIGURA 2** – PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA O DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *A. brasilense*
..... 38
- FIGURA 3** - PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA O DOMÍNIO CENTRAL + C-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *A. brasilense*
..... 39
- FIGURA 4** - PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA O DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *A. vinelandii*
..... 40
- FIGURA 5** - PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA O DOMÍNIO CENTRAL + C-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *A. vinelandii*
..... 41
- FIGURA 6** – PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAB-1 DIGERIDO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO EcoRI
..... 45

| | |
|---|----|
| FIGURA 7 – PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSCAB-1 DIGERIDO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO EcoRI | 46 |
| FIGURA 8 – PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAV-1 DIGERIDO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO EcoRI | 47 |
| FIGURA 9 – PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSCAV-1 DIGERIDO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO EcoRI | 48 |
| FIGURA 10 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS RECOMBINANTES CONTENDO AS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS PARA OS DOMÍNIOS MODULARES DA PROTEÍNA NifA DE <i>A.brasilense</i> e <i>A. vinelandii</i> | 49 |
| FIGURA 11 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAB-2 e pPSCAV-2 DIGERIDOS COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E HindIII | 50 |
| FIGURA 12 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSCAB-2 DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E HindIII | 51 |
| FIGURA 13 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAV-2 DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E HindIII | 52 |
| FIGURA 14 - ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS pNifAQ1Ab e pNifAQ2Ab | 56 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 15 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAB-3 DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E XhoI | 57 |
| FIGURA 16 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAV-3 DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E XhoI | 58 |
| FIGURA 17 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pNifAQ1Ab DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E XhoI | 59 |
| FIGURA 18 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pNifAQ2Ab DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E XhoI | 60 |
| FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA NifAQ1Ab EXPRESSA EM <i>E. coli</i> A PARTIR DO PLASMÍDIO pNifAQ1Ab EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS | 22 |
| TABELA 2 – PLASMÍDIOS | 22 |
| TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS | 25 |
| TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>nifA</i> DE <i>A. brasilense</i> E <i>A. vinelandii</i> | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|---|
| ADP | Adenosina difosfato |
| Amp | Ampicilina |
| Atase | Enzima adeniltransferase |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| Cm | Cloranfenicol |
| D.O. | Densidade ótica |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTPs | 5'-trifosfato de 2'-desoxinucleotídeo |
| DTT | Ditiotreitol |
| e⁻ | Elétron |
| EBP | “Enhancer binding protein” |
| EDTA | Ácido etileno-diamino-tetra-acético |
| GDH | Glutamato desidrogenase |
| GOGAT | Glutamato sintase |
| GS | Glutamina sintetase |
| IHF | “Integration Host Factor” |
| IPTG | β-D-tiogalactopiranosídeo |
| kDa | Quilo dalton |
| kΩ | Quilo ohms |
| Km | Canamicina |
| L | Litro |
| m/v | Massa por volume |
| NADPH | Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido |
| NtrC-P | Proteína NtrC fosforilada |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PEG | Polietileno glicol |
| Pi | Fosfato inorgânico |
| PII-UMP | Proteína PII uridililada |
| RNA | Ácido ribonucléico |

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| SDS | Dodecilsulfato de sódio |
| TAE | Tampão Tris-acetato-EDTA |
| TEMED | N,N,N,N' – tetrametil, etilenodiamina |
| Tris | Tris (hidroximetil)-aminometano |
| UAS | “Upstream Activation Sequence” |
| UMP | 5' monofosfato de uridina |
| UTase | Enzima uridiltransferase |

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio é fundamental para disponibilizar este elemento em uma forma que seja metabolicamente utilizável pela maioria dos organismos. Nas bactérias diazotróficas, que são capazes de fixar nitrogênio, a transcrição dos genes envolvidos neste processo é ativada pela proteína NifA, que tem sua atividade controlada pelos níveis de amônio e oxigênio. Em *Azotobacter vinelandii*, os genes *nifLA* estão agrupados em um operon; a proteína NifA tem atividade constitutiva, mas é inativada por NifL em altas concentrações de amônio e/ou oxigênio. Por outro lado, em *Azospirillum brasilense*, apenas o gene que codifica para a proteína NifA está presente e, neste caso, a própria proteína NifA responde às alterações dos níveis de amônio e oxigênio, através de um mecanismo que envolve sua auto-inibição via o domínio N-terminal. A proteína NifA de *A. brasilense* é composta por três domínios separados por duas regiões interdomínios. O domínio N-terminal está relacionado com o controle da atividade da proteína por amônio enquanto que a sensibilidade ao oxigênio está relacionada ao interdomínio que conecta o domínio central ao domínio C-terminal. O domínio central é responsável pela interação com a RNA polimerase e ativação da transcrição, enquanto o domínio C-terminal interage com seqüências específicas de DNA. Para estudar o mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA de *A. brasilense* e obter uma proteína NifA insensível aos níveis de amônio foram construídos dois genes quiméricos: *nifAQ1Ab*, que codifica o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ligado ao domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*, e *nifAQ2Ab*, que codifica o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ligado ao domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*. Fragmentos de DNA contendo as regiões de interesse foram obtidos por reação de PCR utilizando DNA genômico de *A. brasilense* e um plasmídeo contendo o gene *nifA* de *A. vinelandii* como moldes. Os produtos de PCR foram clonados separadamente no vetor pCR2.1. Após confirmação das seqüências de DNA clonadas, os insertos foram clivados com HindIII e XbaI e ligados no vetor pDK7. Em seguida, os genes quiméricos foram montados no vetor de expressão pET28a, unindo as regiões que correspondem aos domínios N-terminal de *A. brasilense* e central + C-terminal de *A. vinelandii* ou aos domínios N-terminal de *A. vinelandii* e central + C-terminal de *A. brasilense*. A partir da montagem dos genes quiméricos no vetor pET28a foi possível fazer a expressão da proteína quimérica NifAQ1Ab em *E. coli* e determinar as melhores condições para sua solubilização. Os genes quiméricos foram construídos com sucesso e a expressão da proteína quimérica NifAQ1Ab revelou a alta insolubilidade dessa proteína. Os ensaios de expressão mostraram que as melhores condições de expressão foram obtidas após indução a 37°C a partir de 2 horas ou a 18°C durante a noite, utilizando IPTG 0,5mmol/L ou lactose 0,5% como indutores.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter vinelandii*, proteína NifA.

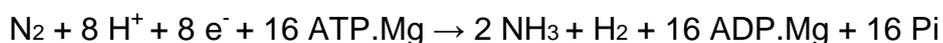
1 INTRODUÇÃO

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Um número relativamente pequeno de bactérias e cianobactérias é capaz de transformar o nitrogênio atmosférico, não assimilável pelas plantas e animais, em amônia, que é utilizada por todos os seres vivos na construção de suas moléculas vitais (PEDROSA, 1987). O processo de redução do dinitrogênio gasoso (N_2) a amônia (NH_3) é chamado de fixação biológica de nitrogênio e é catalisado pelo complexo enzimático denominado nitrogenase (POSTGATE, 1982).

O estudo da fixação biológica de nitrogênio é de grande importância, pois o nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento das plantas (DIXON & KAHN, 2004) e também o mais caro dos fertilizantes agrícolas. A utilização dos fertilizantes nitrogenados não só encarece os custos da produção agrícola, como também acarreta diversos danos ecológicos. Uma alternativa biológica, barata e não poluente seria a presença de microrganismos diazotrofos que convertam o nitrogênio atmosférico a amônia e o disponibilizem para o vegetal (PEDROSA, 1987).

A enzima responsável pela fixação biológica de nitrogênio presente nos organismos diazotrofos é a nitrogenase. Esta enzima catalisa a redução do dinitrogênio gasoso a amônio como mostra a reação abaixo (POSTGATE, 1982):



Este processo é energeticamente custoso para a célula e só ocorre em condições favoráveis. O nitrogênio fixado e o oxigênio afetam a expressão e atividade das proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio nos diversos diazotrofos (POSTGATE, 1982).

1.1.1 Complexo da nitrogenase

O complexo enzimático nitrogenase é constituído de duas proteínas: a dinitrogenase redutase ou proteína ferro (Fe) e a dinitrogenase ou proteína ferro-molibdênio (FeMo) (DEAN & JACOBSEN, 1992). A proteína Fe é um homodímero constituído por duas subunidades γ de massa molecular total de 60kD e codificada pelo gene *nifH* (HOWARD & REES, 1996). Ela possui um núcleo FeS (Fe_4S_4) ancorado entre as duas subunidades e é responsável pela transferência de elétrons para a proteína FeMo (YATES, 1980). A proteína FeMo é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ de massa molecular total de cerca de 220kD. A subunidade α é codificada pelo gene *nifD* e a subunidade β é codificada pelo gene *nifK* (ROBERTS *et al.*, 1978; KIM & REES, 1994). A proteína FeMo contém 2 átomos de Mo, 30 átomos de Fe e 32 átomos de S organizados em 2 tipos de núcleos metálicos: núcleo P (FeS) e cofator ferro-molibdênio (FeMoco). Cada dímero $\alpha\beta$ contém um núcleo P e um cofator FeMoco (KIM & REES, 1994; SCHINDELIN *et al.*, 1997).

Além dos genes *nifHDK*, a biossíntese e o funcionamento do complexo da nitrogenase requer o produto de outros genes, necessários para o transporte de elétrons, regulação transcricional, biossíntese de cofatores e transporte de íons (DIXON & KAHN, 2004).

1.2 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO

A amônia formada no processo de fixação de nitrogênio ou captada do meio externo é utilizada para a síntese de glutamina e glutamato. Na maioria das células, o glutamato e a glutamina funcionam como doadores de nitrogênio em reações biossintéticas. Em procariotos, a assimilação de amônia pode ocorrer por duas vias: na primeira, a glutamina sintetase (GS) catalisa a conversão de glutamato e amônia a glutamina (Reação 1) e a glutamato sintase (GOGAT) catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o α -cetoglutarato, produzindo duas moléculas de

glutamato, em uma reação dependente de NAD(P)H (Reação 2). Na segunda via, a glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a conversão de amônia e α -cetoglutarato em glutamato, em uma reação também dependente de NAD(P)H (Reação 3) (MERRICK & EDWARDS, 1995).

VIA 1

REAÇÃO 1 (catalisada pela glutamina sintetase - GS)



REAÇÃO 2 (catalisada pela glutamato sintase – GOGAT)



VIA 2 (catalisada pela glutamato desidrogenase – GDH)



1.3 GENES *nif*

Os produtos dos genes *nif* são responsáveis pela estrutura, montagem e biossíntese do complexo enzimático da nitrogenase.

Em *K. pneumoniae*, os genes *nif* estão dispostos em 8 operons (*nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVW*, *nifZM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*), compreendendo 20 genes. As proteínas codificadas pelos genes *nifLA* são responsáveis pelo controle da transcrição dos demais genes *nif*, sendo a proteína NifA ativadora da transcrição e a NifL reguladora de NifA em *K. pneumoniae* (MERRICK, 1983; MERRICK *et al.*, 1982).

Em *Azospirillum brasilense*, o gene *nifA* faz parte de um operon monocistrônico (SINGH *et al.*, 1989), diferente do que ocorre em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, onde o gene *nifA* faz parte do operon *nifLA*.

1.3.1 Regulação da expressão dos genes *nif*

A transcrição dos genes *nif* é ativada a partir de promotores contendo uma seqüência conservada (CTGGYAYR-N₄-TTGCA) nas regiões -25/-24 e -13/-12 em relação ao início da transcrição (FISCHER, 1994). Estes promotores são reconhecidos por uma forma da holoenzima RNA polimerase contendo o fator σ^{54} ou σ^N .

A proteína NifA, uma proteína ativadora de transcrição da família das EBP (“enhancer binding protein”), atua em conjunto com a enzima σ^N -RNA polimerase para catalisar a formação do complexo aberto para início da transcrição (AUSTIN *et al.*, 1990). Sem a presença da proteína ativadora, a σ^N -RNA polimerase é incapaz de se isomerizar de complexo fechado para complexo aberto. A proteína ativadora atua como um efetor positivo da transcrição de promotores σ^N e sua atividade é controlada por sinais fisiológicos. A interação da RNA polimerase com a proteína ativadora requer a formação de dobras no DNA. O dobramento do DNA pode ser facilitado ou induzido pela ligação da proteína IHF (“Integration Host Factor”).

As EBP são de uma classe única de reguladores transcricionais procarióticos que ativam a expressão do gene através de sítios distantes do promotor. A proteína NifA liga-se a uma seqüência conservada, denominada UAS (“Upstream Activator Sequence”) (5'-TGT-N₁₀-ACA-3'), localizada a montante do promotor -24/-12. Essa seqüência está presente na maioria dos promotores dependentes de NifA e localiza-se a uma distância de 80 a 150 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição (MORETT & BUCK, 1988). A formação do complexo aberto e início de transcrição requer a hidrólise de ATP catalisada pela proteína NifA (AUSTIN *et al.*, 1990).

A seqüência UAS juntamente com a seqüência reconhecida pela σ^N -RNA polimerase formam uma região promotora ativa. Aparentemente, a função da UAS seria orientar corretamente a NifA para facilitar a interação com o complexo σ^N -RNA polimerase e aumentar a concentração da proteína NifA na vizinhança do complexo fechado (BUCK *et al.*, 1987).

A regulação da transcrição dos genes *nif* é mediada inteiramente pela regulação da expressão e controle da atividade da proteína NifA. Não existem evidências que mostrem que a transcrição seja regulada de forma negativa por algum repressor de transcrição. Em todos os diazotrofos estudados, a fixação biológica de nitrogênio é regulada, principalmente, a nível transcricional e este controle é mediado em resposta ao oxigênio e nitrogênio fixado.

1.3.2 Regulação da expressão do gene *nifA*

Em *K. pneumoniae*, o gene *nifA* forma um operon com o gene *nifL*, cujo produto, a proteína NifL, tem função inibitória de NifA (MERRICK *et al.*, 1982). A expressão do operon *nifLA* ocorre em baixos níveis de amônia e necessita do fator σ^N e da proteína ativadora NtrC fosforilada, cuja atividade é controlada pelo sistema *ntr* (ver item 1.3) (MERRICK & CHAMBERS, 1992). Em relação ao oxigênio, a expressão é controlada pelo estado superenrolado do promotor *nifLA* (WHITEHALL *et al.*, 1992).

Em *Rhizobium meliloti*, a expressão dos genes de fixação de nitrogênio é induzida sob baixas concentrações de oxigênio, sendo regulada por um sistema de dois componentes, que consiste nas proteínas FixL e FixJ. Na ausência de oxigênio, a proteína FixL, uma proteína quinase sensora de oxigênio através de seu grupamento heme, fosforila a proteína FixJ. A proteína FixJ fosforilada atua como um ativador de transcrição do gene *nifA* (GILLES-GONZALES *et al.*, 1991). O gene *nifA* também pode ser transcrito a partir do operon *fixAABCXnifA*, através de ativação dependente de NtrC em baixos níveis de amônio e anaerobiose (DITTA *et al.*, 1987).

Em *A. brasilense*, a análise da região promotora do gene *nifA* sugere que a sua transcrição, embora estimulada na ausência de amônia, é independente de NtrC (LIANG *et al.*, 1991; 1993; FADEL-PICHETH *et al.*, 1999). A caracterização da região promotora indicou um promotor do tipo σ^{70} como provável promotor do gene

nifA e a repressão máxima desse gene depende do efeito combinado entre amônio e oxigênio (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999).

1.4 PROTEÍNA NifA

A maioria das proteínas NifA conhecidas possuem três domínios estruturais típicos. O domínio N-terminal varia de 64 a 216 aminoácidos, possui um baixo grau de identidade e é o domínio mais variável entre as proteínas NifA (FISCHER, 1994). Este domínio está relacionado com o controle da atividade de NifA frente ao nitrogênio fixado e, em *H. seropedicae*, este domínio parece estar envolvido no controle da atividade da proteína NifA por íons amônio, uma vez que, ao ser deletado, não interfere na atividade de ativação de transcrição da proteína, eliminando, porém, a inibição por amônio (SOUZA *et al.*, 1999). Em *Azospirillum brasilense*, esse domínio também possui função inibitória sobre a atividade de NifA na presença de amônia (ARSÈNE *et al.*, 1996). Por outro lado, a proteína NifA de *A. brasilense* sem o domínio N-terminal é menos ativa que a selvagem em condições de fixação de nitrogênio, sugerindo que esse domínio possa ser necessário para uma atividade ótima, provavelmente por manter os outros domínios em uma conformação mais favorável ou por aumentar a estabilidade da proteína (ARSÈNE *et al.*, 1996). O domínio N-terminal compreende um domínio GAF que corresponde a um motivo sinalizador encontrado em várias proteínas sensoras e sinalizadoras (ARAVIND & PONTING, 1997; HO *et al.*, 2000), sendo capaz de ligar pequenas moléculas. Foi mostrado por Little e Dixon (2003) que a ligação do efector α -cetogluturato à proteína NifA de *A. vinelandii* é uma propriedade do seu domínio GAF isolado. Esses mesmos autores sugerem que a ligação do α -cetogluturato no domínio GAF da proteína NifA possa levar a mudanças conformacionais na proteína, tornando-a capaz de resistir a inibição por NifL.

Em *A. vinelandii*, a atividade da proteína NifA é inibida pela proteína NifL em resposta a altas concentrações de oxigênio ou amônia. O controle de NifA pela

proteína NifL é dependente da proteína paráloga de GlnB, GlnK (HE *et al.*, 1998; JACK *et al.*, 1999; REYES-RAMIREZ *et al.*, 2001; LITTLE *et al.*, 2000; 2002).

Os domínios central e C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* estão ligados diretamente. Já em *A. brasilense*, estes domínios estão conectados por uma seqüência interdomínio (FISCHER, 1994). Este interdomínio possui duas cisteínas que, juntamente com mais duas cisteínas do domínio central, constituem um sítio de ligação de metais em potencial. Foi proposto que íons Fe possam se ligar a este sítio, sendo, portanto, sensível a variações no potencial redox intracelular, estando envolvido na sensibilidade da proteína NifA à inativação por oxigênio (FISCHER *et al.*, 1989; SOUZA *et al.*, 1999).

O domínio C-terminal, com cerca de 50 resíduos, contém um motivo conservado em hélice-volta-hélice, que é envolvido na ligação ao DNA (LEE *et al.*, 1993).

1.5 CONTROLE DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA

Em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, a atividade da proteína NifA é inibida pela proteína NifL em resposta a altas concentrações de oxigênio ou íons amônio (DIXON *et al.*, 1997). Estas duas proteínas são expressas estequiometricamente e formam um complexo protéico.

Apesar de a proteína NifA apresentar similaridade com a proteína NtrC, ela não é uma proteína clássica da família de reguladores de resposta de sistema de dois componentes. O domínio N-terminal não possui o resíduo de aspartato conservado, que é o sítio de fosforilação em proteínas reguladoras de resposta como NtrC e não existe nenhuma evidência de que NifA seja fosforilada em qualquer condição (MERRICK, 2004). Assim, as proteínas NifL e NifA fazem parte de um sistema atípico de dois componentes, sendo que a comunicação entre as proteínas não envolve fosforilação e sim uma comunicação proteína-proteína (DIXON *et al.*, 1997). É possível que a proteína NifL possa interferir em vários passos do mecanismo de ação da proteína NifA. Em *A. vinelandii*, a proteína NifL inibe a

capacidade de ligação ao DNA, a atividade ATPásica e a capacidade de ativadora de transcrição da proteína NifA nativa *in vitro* (AUSTIN *et al.*, 1994).

A proteína NifL é uma flavoproteína redox-sensitiva, capaz de modular a atividade da proteína NifA de acordo com o estado de oxidação do FAD (HILL *et al.*, 1996). Ela também exerce uma atividade inibitória sobre a proteína NifA na presença de altos níveis de nitrogênio fixado. Evidências sugerem que componentes do sistema geral de sensoriamento de nitrogênio (sistema *ntr*) possam estar envolvidos (CONTRERAS *et al.*, 1991). A inativação de um gene homólogo a *glnD* em *A. vinelandii* resulta em um fenótipo *nif*. Esse fenótipo é revertido por uma mutação no gene *nifL*, sugerindo que a Utase possa ser necessária para manter a NifL inativa em condições de baixos níveis de amônio (CONTRERAS *et al.*, 1991).

Em *H. seropedicae* e *A. brasilense*, não há proteína NifL. A proteína NifA tem sua atividade controlada negativamente pelos níveis de oxigênio e pela concentração de amônia (FISCHER *et al.*, 1988). Em *A. brasilense*, a proteína NifA é expressa tanto na presença quanto na ausência de nitrogênio fixado. A proteína NifA parece estar presente em uma forma ativa ou inativa dependendo dos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. A proteína NifA de *A. brasilense* só foi capaz de ativar a expressão de uma fusão *nifH:lacZ* em *E. coli* quando a proteína GlnB de *A. brasilense* estava presente na ausência de amônio (ARAÚJO *et al.*, 2004). Já a proteína NifA sem o domínio N-terminal é ativa independente da presença da proteína PII e de nitrogênio fixado (ARSÈNE *et al.*, 1996). Vários dados levam a formulação de uma hipótese de que, em *A. brasilense*, a região N-terminal da NifA inibe a atividade da proteína em condições de excesso de nitrogênio e que em condições de fixação de nitrogênio, GlnB-UMP se ligaria à NifA, removendo o efeito inibitório do domínio N-terminal (ARSÈNE *et al.*, 1999).

Portanto, em organismos como *A. vinelandii* e *K. pneumoniae*, a proteína NifL sofre alterações na presença de oxigênio e amônio, podendo assim atuar sobre a proteína NifA, inibindo-a. Já em organismos como *A. brasilense* e *H. seropedicae*, a própria proteína NifA é que sofre as alterações em resposta direta a variação dos níveis de oxigênio e amônia, não havendo participação da proteína NifL.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA de *Azospirillum brasilense* e obter uma proteína NifA insensível aos níveis de amônio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção do gene quimérico *nifAQ1Ab*, que codifica o domínio N-terminal da proteína NifA de *Azospirillum brasilense* ligado ao domínio central + C-terminal da proteína NifA de *Azotobacter vinelandii*.
- Construção do gene quimérico *nifAQ2Ab*, que codifica o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ligado ao domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*.
- Expressão da proteína quimérica NifAQ1Ab em *E. coli*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDIOS

TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS

| <i>Escherichia coli</i> | Característica | Referência |
|-------------------------|---|-------------------------------|
| BL21 (λDE3) pLysS | <i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ <i>clts</i> 857 <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7</i> gene 1) (produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs). | SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989 |
| DH10B | F' [<i>proAB</i> , <i>lacZ</i> ΔM15], NaI ^R | SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989 |

TABELA 2 – PLASMÍDIOS

| Plasmídeos | Característica | Referência |
|------------|--|------------------------------|
| pCR2.1 | Vetor de clonagem/ promotor <i>lac</i> . Km ^R Amp ^R . | Invitrogen |
| pDK7 | Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> . Cm ^R . | KLEINER <i>et al.</i> , 1988 |
| pET28a | Vetor de expressão/ promotor T7. Km ^R . Gera proteína de fusão com His-Tag. | Novagen |
| pNifAQ1Ab | Contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> ligada à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de <i>A. vinelandii</i> clonada no vetor pET28a. | Este trabalho |
| pNifAQ2Ab | Contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. vinelandii</i> ligada à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> clonada no vetor pET28a. | Este trabalho |
| pPSCAB-1 | Contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> clonada no vetor pCR2.1. | Este trabalho |

| | | |
|----------|--|---------------|
| pPSCAB-2 | Contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> clonada no vetor pDK7. | Este trabalho |
| pPSCAV-1 | Contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de <i>A. vinelandii</i> clonada no vetor pCR2.1. | Este trabalho |
| pPSCAV-2 | Contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de <i>A. vinelandii</i> clonada no vetor pDK7. | Este trabalho |
| pPSNAB-1 | Contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> clonada no vetor pCR2.1. | Este trabalho |
| pPSNAB-2 | Contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> clonada no vetor pDK7. | Este trabalho |
| pPSNAB-3 | Contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> clonada no vetor pET28a. | Este trabalho |
| pPSNAV-1 | Contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. vinelandii</i> clonada no vetor pCR2.1. | Este trabalho |
| pPSNAV-2 | Contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. vinelandii</i> clonada no vetor pDK7. | Este trabalho |
| pPSNAV-3 | Contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. vinelandii</i> clonada no vetor pET28a. | Este trabalho |

3.2 MEIOS DE CULTURA

3.2.1 Meios empregados para o cultivo de *E. coli*

Os meios de cultura utilizados no cultivo das estirpes de *E.coli* foram: Luria-Broth (LB) e LA.

O meio LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) apresentou a seguinte composição:

| | gramas/litro |
|---------------------|--------------|
| Extrato de Levedura | 5,0 |
| Cloreto de sódio | 10,0 |
| Triptona | 10,0 |

O meio LA foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15g/L ao meio líquido LB.

Para preparo de células competentes, foi utilizado o meio SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989), com a seguinte composição:

| | gramas/litro |
|---------------------|--------------|
| Extrato de Levedura | 5,0 |
| Triptona | 20,0 |
| NaCl | 0,6 |
| KCl | 0,186 |

O meio SOC foi obtido com a adição de glucose 3,6g/L, MgCl₂ 0,94g/L e MgSO₄ 1,2g/L ao meio SOB.

3.2.2 Meio empregado para o cultivo de *A. brasilense*

O meio NFbHP foi utilizado para o cultivo de *A. brasilense* (PEDROSA & YATES, 1984) e apresentou a seguinte composição:

| | gramas/litro |
|--------------------------------------|----------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 4,0 |
| K ₂ HPO ₄ | 6,0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 2,0.10 ⁻¹ |
| NaCl | 1,0.10 ⁻¹ |
| CaCl ₂ | 2,0.10 ⁻¹ |
| Ácido nitrilo triacético | 5,6.10 ⁻² |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 2,0.10 ⁻² |

| | |
|---|----------------------|
| Lactato de sódio | 5,0 |
| Biotina | $1,0 \cdot 10^{-4}$ |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | $2,0 \cdot 10^{-3}$ |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | $2,35 \cdot 10^{-3}$ |
| H_3BO_3 | $2,8 \cdot 10^{-3}$ |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | $8,0 \cdot 10^{-5}$ |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | $2,4 \cdot 10^{-4}$ |

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 20mmol/L. A mistura de fosfato e a solução NH_4Cl foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso. O meio NFbHP sólido foi obtido pela adição ao meio líquido de ágar bacteriológico 15g/L.

3.3 ANTIBIÓTICOS

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

| Antibióticos | Solução estoque (mg/mL) | Concentração final ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------------|-------------------------|---|
| Ampicilina (Amp) | 200 | 200 |
| Canamicina (Km) | 50 | 50 |
| Cloranfenicol (Cm) | 30 | 30 |

As soluções estoque de antibióticos, exceto cloranfenicol, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizada por filtração (Millipore HAWP 0,22 μm). A solução estoque de cloranfenicol foi preparada em etanol 70%. Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -20°C .

3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB, SOB ou SOC a temperatura de 37°C sob agitação. Para estes cultivos, sempre foi mantida a relação 1/5 de volume de meio para volume total do frasco. Esta relação foi utilizada para manutenção da aeração durante o crescimento.

Para cultivo de *E. coli* em meio sólido foi utilizado o meio LA e as placas mantidas a 37°C.

3.5 ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS

Os estoques das estirpes de *E. coli* foram preparados centrifugando 1,5mL da cultura saturada por 60 segundos a 13.000 x g. O sedimento de células obtido foi ressuspensionado em 400µL de glicerol 50% e conservado a -20°C.

3.6 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE *Azospirillum brasilense*

Cinco mililitros de uma cultura saturada de *A. brasilense* em NfbHPN foi centrifugada a 4000 x g por 5 minutos, 4°C. O sedimento de células foi lavado uma vez com 5mL de GET (50mmol/L glucose, 25mmol/L Tris.HCl pH 8.0, 10mmol/L EDTA) e, em seguida, ressuspensionado em 500µL da mesma solução. Foi adicionado 50µL de SDS 10% e lisozima (100µg/mL). Esta suspensão foi incubada a 55°C por 40 minutos. Após a lise celular, foi adicionado Proteinase K (50µg/mL) e a mistura incubada a 37°C durante a noite.

Para a purificação do DNA, foi feita uma extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e outra com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA genômico foi precipitado com um volume de isopropanol, depois com

1,5mL de etanol absoluto e lavado com etanol 80%. Depois de seco a vácuo, o DNA foi dissolvido em 30 μ L de água.

3.7 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR

A amplificação das regiões que codificam para os domínios N-terminal e central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii* foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por Kocher e Wilson (1991). Foram utilizados oligonucleotídeos sintetizados quimicamente e que se alinhavam em diferentes regiões do gene *nifA* de *A. brasilense* e *A. vinelandii* para permitir a amplificação das regiões de interesse separadamente.

Para a reação de amplificação foram utilizados: tampão 1X de PCR (20mmol/L Tris.HCl pH 8.4 e 50mmol/L KCl), 0,8mmol/L dNTPs, 10pmol de cada “primer”, 0,6mmol/L MgCl₂, aproximadamente 20ng de DNA molde e 0,8 μ L de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 20 μ L. Para a amplificação da região central e C-terminal de *A. brasilense* foi utilizado, além dos reagentes acima descritos, 1 μ L de DMSO.

Os parâmetros utilizados para os ciclos de amplificação foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto na temperatura de anelamento dos “primers”, 1,5 minutos a 72°C e 15 minutos a 72°C. Para as temperaturas de anelamento foram utilizados gradientes de temperatura de 50°C \pm 5°C para a amplificação das regiões N-terminal e central + C-terminal do gene *nifA* de *A. brasilense* e 41°C \pm 5°C para a amplificação das regiões N-terminal e central + C-terminal do gene *nifA* de *A. vinelandii*. A confirmação das amplificações se deu através de eletroforeses em gel de agarose 1% utilizando tampão TAE 1X.

3.8 SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose horizontal conforme descrito por Sambrook (1989). Os géis de agarose foram preparados em tampão TAE (40mmol/L Tris-acetato e 1mmol/L EDTA pH 8.3). A concentração de agarose variou de 1,0 a 1,5%, dependendo do tamanho de DNA analisado.

O DNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta após tratamento com solução de brometo de etídio.

3.9 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS AO VETOR pCR2.1

O vetor pCR2.1 (Invitrogen) já vem linearizado. A ligação dos produtos de PCR foi realizada em um sistema contendo tampão de ligação (50mmol/L Tris.HCl pH 7.6, 10mmol/L MgCl₂, 1mmol/L DTT, 0,5mmol/L ATP, 5% de PEG 8000) e 0,8 U de T4 DNA Ligase, incubado a 18°C durante a noite. A proporção usada de vetor:inserto foi de 1:5 (mol).

3.10 DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E PREPARO DOS VETORES

A digestão do DNA para clonagem nos vetores de expressão pDK7 e pET28a foi feita segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) ou especificado pelo fabricante.

Uma a cinco unidades das diferentes enzimas de restrição foram utilizadas para digestão de 0,2-1,0µg de DNA, em um volume de 50µl durante a noite na presença do tampão e temperatura adequados para cada enzima. Para apenas análise do padrão de restrição, o volume final utilizado foi de 10µL.

3.11 LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR

Após a digestão do DNA e do vetor, as enzimas foram desnaturadas por calor (85°C por 20 minutos). Então, o vetor linearizado foi ligado ao inserto na proporção de 1:5 e esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e resfriada no gelo, como descrito em Sambrook *et al.* (1989). Em seguida, foi adicionado ao sistema o tampão de ligação (50mmol/L Tris.HCl pH 7.6, 10mmol/L DDT, 0,5mmol/L ATP, 5% de PEG 8000) e 1,0µL de T4 DNA ligase e incubado a 18°-21°C durante a noite.

3.12 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.12.1 Preparo de bactérias eletrocompetentes para eletroporação

Trezentos mililitros de meio LB foram inoculados com 3mL de uma cultura de *E. coli* crescida durante 12 horas. A cultura ficou a 37°C sob agitação até atingir uma D.O.₆₀₀ igual a 0,5. Então, a cultura foi mantida em gelo durante 20 minutos e transferida para tubos estéreis, sendo em seguida centrifugada a 2500 x g durante 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 300mL de água estéril gelada e, posteriormente, com 5mL de glicerol 10%. Após centrifugação, o sedimento foi ressuscitado em 0,5mL de glicerol 10% e a suspensão aliqüotada em tubos tipo “ependorf” (40µL) e armazenada a -70°C por até 6 meses.

3.12.2 Transformação bacteriana

O método utilizado para transformação bacteriana foi descrito pelo fabricante do Cell Porator (Life-Technologies). A mistura da ligação ou plasmídios purificados foram adicionados a 40µL da suspensão de células eletrocompetentes e incubado por 1 minuto no gelo. Em seguida, as células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um campo elétrico (4KΩ, 330µF) a fim de possibilitar a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 200µL de meio SOC e incubadas por 40 minutos a 37°C sob agitação. Então, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo antibiótico adequado para a seleção dos transformantes de interesse.

3.13 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O isolamento dos plasmídios e vetores contidos nas bactérias *E. coli* foi feita segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). 1,5mL de cultura incubada durante 12 horas foi centrifugado por 60 segundos a 13000 x g a temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspensado em 150µL de GET e as células lisadas pela adição de 150µL de solução de lise (SDS 1% e NaOH 0,2mol/L). Em seguida, foi adicionado mais 150µL de acetato de potássio 3mol/L pH 4.8 e incubado por 10 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e a ele adicionado 100µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Essa mistura novamente foi centrifugada a 13000 x g por 5 minutos e ao sobrenadante foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto para precipitar o DNA plasmidial por 15 minutos. Então, a mistura foi centrifugada a 13000 x g por 15 minutos e depois lavada com etanol 80%. Depois de seco, o DNA plasmidial foi dissolvido em 30µL de água.

3.14 ANÁLISE DOS PLASMÍDIOS

As colônias resultantes da transformação bacteriana e que cresceram no meio selecionado pelo antibiótico adequado foram crescidas em 3mL de meio líquido LB com o antibiótico. 1,5mL foram utilizados para preparar a solução estoque (Material e Métodos item 3.5) e os outros 1,5mL foram utilizados para extração do plasmídeo (Material e Métodos item 3.13) e posterior análise por padrão de restrição. O volume total de 10 μ L foi utilizado em uma eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a presença do inserto de interesse.

3.15 SEQUENCIAMENTO DO DNA

A reação de sequenciamento de DNA se baseou no método descrito por Sanger e Coulson (1977), utilizando didesoxirribonucleotídeos fluorescentes como terminadores de cadeia. A leitura dos produtos da reação de sequenciamento foi feita em um seqüenciador automático de DNA (Applied Biosystems modelo 377). Como DNA molde, foram usados plasmídios purificados pelo método de lise alcalina como descrito no item 3.13, com duas modificações: foram realizadas duas ressuspensões em GET em vez de apenas uma e antes do DNA plasmidial ser precipitado com etanol absoluto, foi adicionado RNase 10 μ g/mL e incubado por 1 hora a 37°C.

A reação de sequenciamento continha 2 μ L de DNA purificado (1-5 μ g), 3 μ L de tampão ET terminator (GE Healthcare), 10pmol do oligonucleotídeo específico para a seqüência de interesse e água para um volume final de 7,5 μ L. Os parâmetros de amplificação foram definidos de acordo com os iniciadores utilizados.

Após a reação de sequenciamento, o produto foi transferido para um tubo tipo eppendorf de 0,6mL e acrescentado 2,0 μ L de acetato de amônio, 60,0 μ L de etanol absoluto e 12,5 μ L de água. Esta mistura foi mantida a temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugada a 13000 x g por mais 30 minutos. Então, o DNA foi

lavado com etanol 80% e seco a vácuo. O produto foi dissolvido em solução contendo blue dextran e formamida, conforme recomendação do fabricante e a amostra foi lida no seqüenciador automático.

A análise das seqüências de nucleotídeos obtida foi realizada utilizando o programa BLAST Search (NCBI/GenBank) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

3.16 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NifAQ1Ab EM *E. coli*

Seis mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS transformada com os plasmídios pNifAQ1Ab1 ou pNifAQ2Ab crescida durante a noite. As células foram cultivadas a 37°C sob agitação até atingir a DO₆₀₀ próximo a 1,0. Neste ponto, foi adicionado IPTG para concentração final de 0,5mmol/L ou 0,5% (p/v) de lactose, seguido de incubação sob agitação constante a 30°C por 3 horas. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação (13000 x g por 5 minutos a 4°C). Para análise das proteínas, o sedimento de células foi ressuspensionado em 400 μ L de tampão de sonicação (50mmol/L Tris.HCl pH 7.5, 100mmol/L KCl, glicerol 20%). As células foram lisadas por sonicação por 2 minutos em ciclos de 20 segundos seguidos de 1 minuto de intervalo, no gelo, utilizando o sonicador Heat System equipado com microponeta. A mistura lisada foi centrifugada a 13000 x g por 5 minutos a 4°C. As frações solúvel e insolúvel foram separadas e analisadas através de separação eletroforética em géis de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). Os géis foram corados com Coomassie Blue R250.

3.17 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES

A eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gel de poliacrilamida como descrito por Laemmli (1970). A

concentração do gel de corrida variou de 10% a 15% de acordo com a massa molecular da proteína analisada. A eletroforese foi realizada em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (BioRad ou Höeffer). A corrida foi realizada a 180 V por 1 hora e o gel corado com Coomassie Blue.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES CODIFICADORAS DOS DOMÍNIOS N-TERMINAL E CENTRAL + C-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *Azospirillum brasilense* E *Azotobacter vinelandii*

A proteína NifA é ativadora da transcrição dos genes envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio. Em *Azotobacter vinelandii*, a proteína NifA faz parte do operon *nifLA*; a proteína NifA tem atividade constitutiva, mas é inativada por NifL em altas concentrações de amônio e/ou oxigênio. Por outro lado, em *Azospirillum brasilense*, apenas o gene que codifica para a proteína NifA está presente e, neste caso, a própria proteína NifA responde às alterações dos níveis de amônio e oxigênio, através de um mecanismo que envolve sua auto-inibição via o domínio N-terminal. Este domínio está relacionado com o controle da atividade da proteína por amônio enquanto que a sensibilidade ao oxigênio está relacionada ao interdomínio que conecta o domínio central ao domínio C-terminal. O domínio central é responsável pela interação com a RNA polimerase e ativação da transcrição, enquanto o domínio C-terminal interage com seqüências específicas de DNA. Para estudar o mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA de *A. brasilense* e obter uma proteína NifA insensível aos níveis de amônio foram construídos dois genes quiméricos: *nifAQ1Ab*, que codifica o domínio N-terminal de *A. brasilense* ligado ao domínio central + C-terminal de *A. vinelandii*, e *nifAQ2Ab*, que codifica o domínio N-terminal de *A. vinelandii* ligado ao domínio central + C-terminal de *A. brasilense* (Figura 1). Para realizar estas construções, as seqüências codificadoras para os domínios N-terminal e central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii* foram obtidas através de reações de PCR. Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para cada região. As seqüências dos oligonucleotídeos encontram-se na Tabela 4. Os “primers” foram construídos de modo a possuírem sítios de restrição na seqüência desejada para facilitar as clonagens e montagem dos genes quiméricos.

TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nifA* DE *A. brasilense* E *A. vinelandii*

5' N-terminal - CAT ATG CCG GGT GCA ATG CG - N-terminal – *nifA* de *A. brasilense*, sentido 5', posição 437-456

Ab2Q - GAC CAC GTC ACT AGT CGG GGC – N-terminal – *nifA* de *A. brasilense*, sentido 3', posição 1037-1057

Ab1Q - GCC CCG ACT AGT GAC GTG GTC – Central e C-terminal – *nifA* de *A. brasilense*, sentido 5', posição 1037-1057

3' C-terminal - GGT GGA TCC CGC GTA CAT GAT – Central e C-terminal – *nifA* de *A. brasilense*, sentido 3', posição 2363-2383

AV1 - CGA CAG GGA TCC CAT ATG AAT – N-terminal – *nifA* de *A. vinelandii*, sentido 5', posição 317-337

NifA AV2Q - CAC CAC CAT ACT AGT GAA GCC – N-terminal – *nifA* de *A. vinelandii*, sentido 3', posição 947-967

NifA AV1Q - GGC TTC ACT AGT ATG GTG GTG – Central e C-terminal – *nifA* de *A. vinelandii*, sentido 5', posição 947-967

AV2 - GTC CCG GGA TCC CTT GCG CAT – Central e C-terminal – *nifA* de *A. vinelandii*, sentido 3', posição 1886-1906

Os nucleotídeos em vermelho indicam os sítios de restrição. A seqüência CAT ATG corresponde ao sítio de restrição para a enzima NdeI, a seqüência ACT AGT para a enzima SpeI e a seqüência GGA TCC para a enzima BamHI.

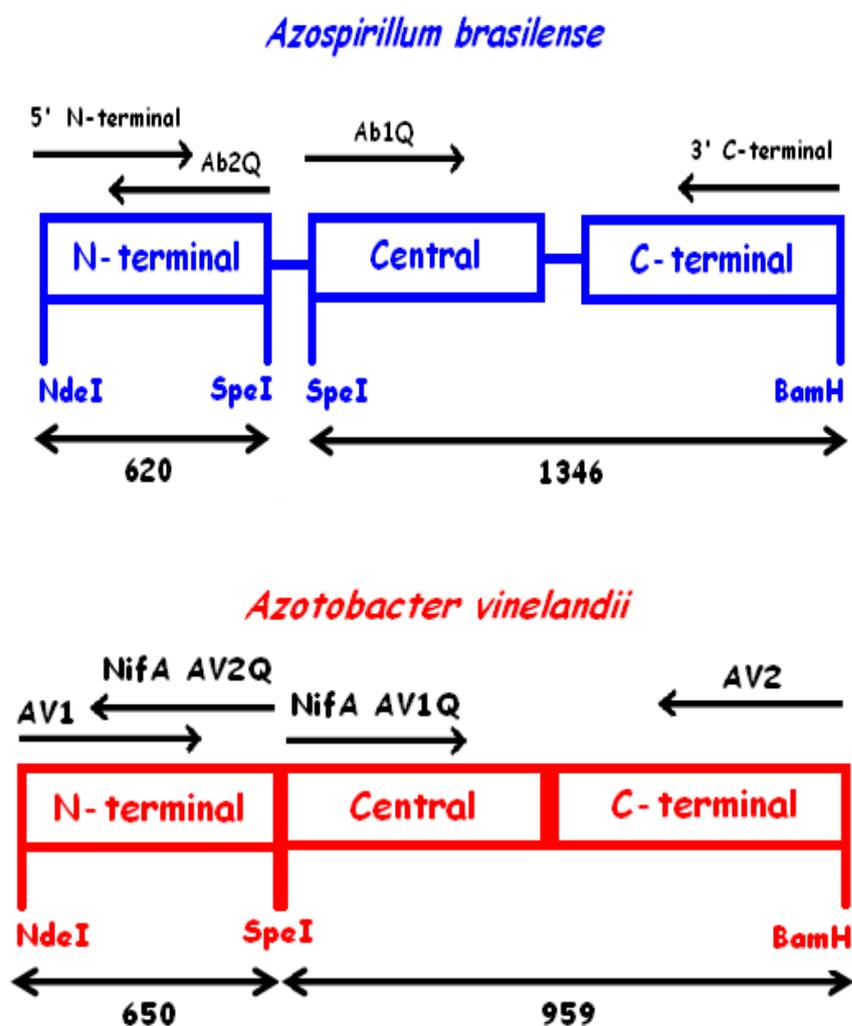
Para a amplificação da região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* foram utilizados os iniciadores 5' N-terminal e Ab2Q e para a amplificação da região que codifica para os domínios central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* foram utilizados os iniciadores Ab1Q e 3' C-terminal. O DNA genômico de *A. brasilense* serviu de molde para ambas as reações. Para a amplificação da região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* foram utilizados os iniciadores AV1 e NifA AV2Q e para a amplificação da região que codifica para os domínios central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* foram utilizados os iniciadores NifA AV1Q e AV2.

Os parâmetros utilizados para os ciclos de amplificação foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto na temperatura de anelamento dos “primers”, 1,5 minutos a 72°C e 15 minutos a 72°C. Vários

programas e condições foram testadas até que a obtenção dos fragmentos do tamanho esperado fosse atingida. Para as temperaturas de anelamento foram utilizados gradientes de temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ para a amplificação das regiões do gene *nifA* de *A. brasilense* e $41^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ para a amplificação das regiões do gene *nifA* de *A. vinelandii*. A temperatura ideal de anelamento obtida para os “primers” que amplificam as regiões do gene *nifA* de *A. brasilense* foi de 50°C para a região que codifica para o domínio N-terminal e de $51,8^{\circ}\text{C}$ para a região que codifica para o domínio central + C-terminal. Para a amplificação da região que codifica para o domínio central + C-terminal de *A. brasilense* foi necessário utilizar $1\mu\text{L}$ de DMSO 5%. Já para a amplificação das regiões do gene *nifA* de *A. vinelandii*, a temperatura de anelamento ótima foi de $45,1^{\circ}\text{C}$.

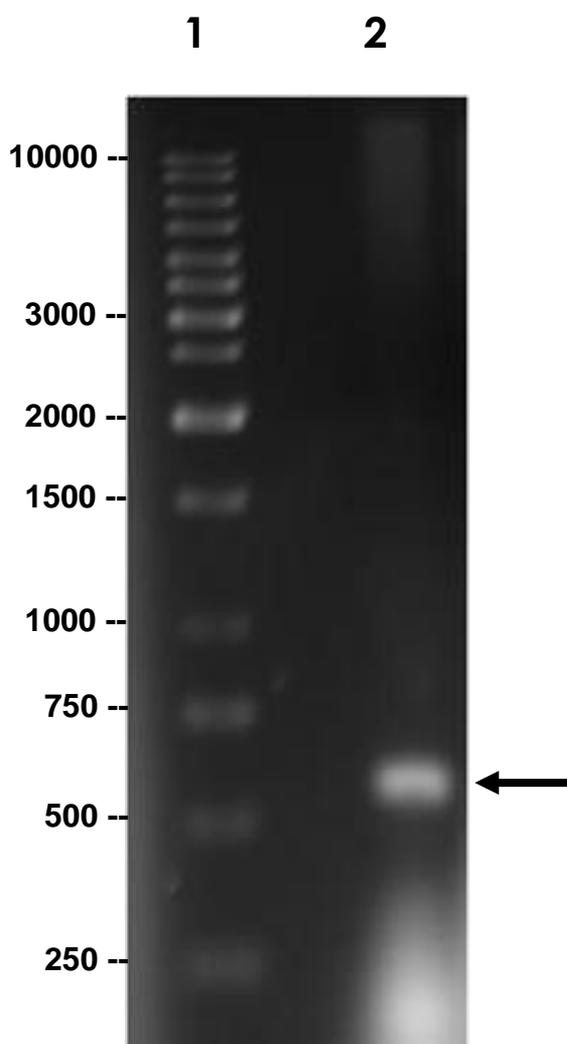
Através da análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose 1,5%, verificou-se que os fragmentos obtidos possuíam o tamanho esperado para cada região amplificada. O fragmento obtido com tamanho aproximado de 600 pares de bases corresponde ao tamanho da região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* (Figura 2). O fragmento de aproximadamente 1400 pares de bases corresponde ao tamanho da região que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* (Figura 3). A amplificação da região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* resultou em duas bandas. Uma corresponde ao tamanho esperado da região de interesse com 650 pares de bases e a outra banda, de aproximadamente 1000 pares de bases corresponde a uma amplificação inespecífica (Figura 4). Mesmo testando um gradiente de temperatura para o anelamento dos “primers”, esta condição não foi eliminada, já que em outras temperaturas não havia amplificação ou apareciam outras bandas de tamanho não esperado. O fragmento de aproximadamente 1000 pares de bases corresponde ao tamanho esperado para a região que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* (Figura 5).

FIGURA 1 – ESQUEMA DO ALINHAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS À SEQUÊNCIA CODIFICADORA DOS DOMÍNIOS MODULARES DA PROTEÍNA NifA DE *A. brasilense* E *A. vinelandii*



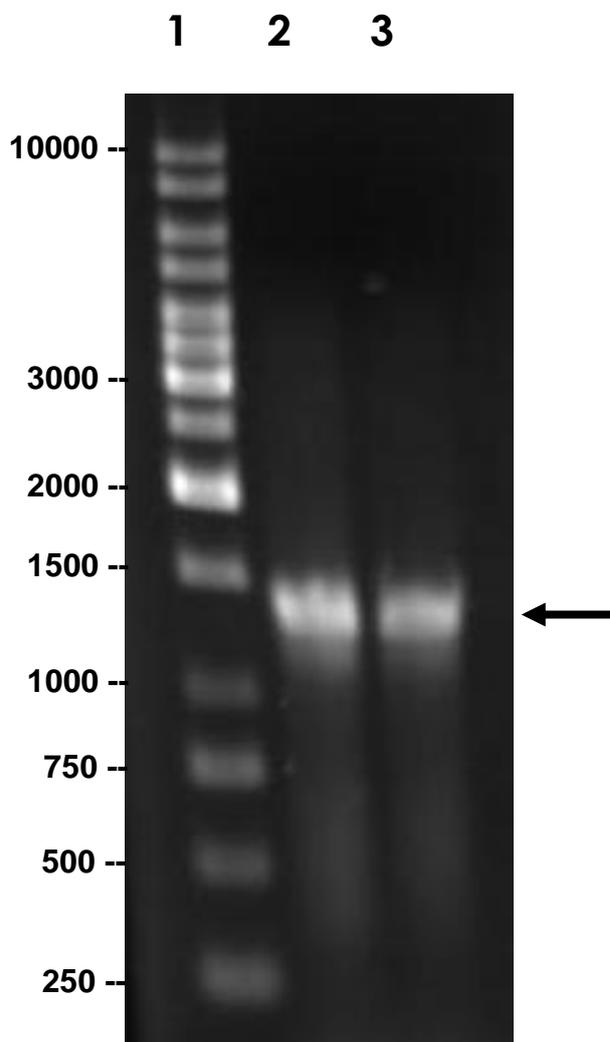
A figura mostra o alinhamento dos oligonucleotídeos às regiões do gene *nifA* de *A. brasilense* e *A. vinelandii* e o tamanho dos seus respectivos fragmentos. Os iniciadores 5' N-terminal e Ab2Q foram utilizados para a amplificação da região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*; os iniciadores Ab1Q e 3' C-terminal foram utilizados para a amplificação da região que codifica para os domínios central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*; os iniciadores AV1 e NifA AV2Q foram utilizados para a amplificação da região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*; os iniciadores NifA AV1Q e AV2 foram utilizados para a amplificação da região que codifica para os domínios central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*.

FIGURA 2 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA O DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *A. brasilense*



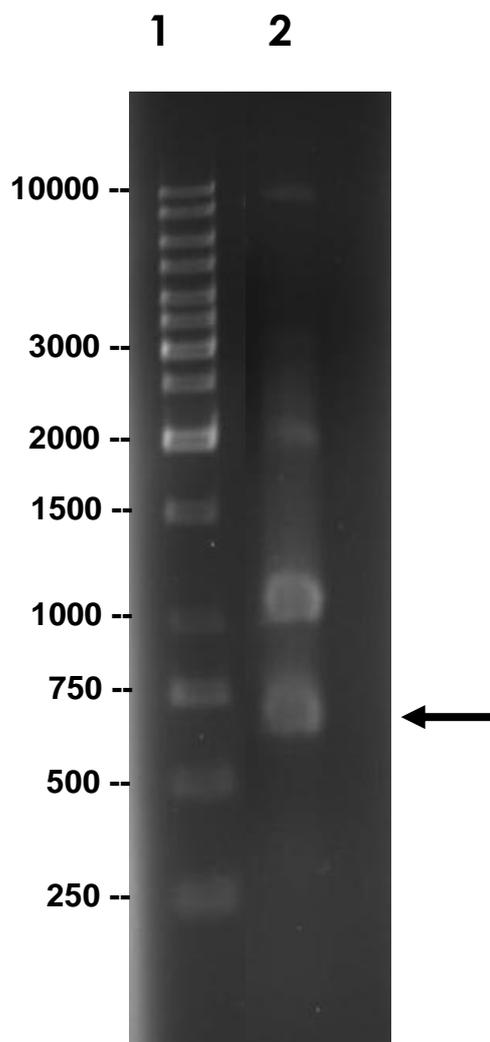
Linha 1 – Padrão de massa molecular 1 kb ladder; linha 2 – Fragmento de DNA correspondendo à região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*, com aproximadamente 600 pares de bases. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta indica o fragmento obtido por PCR na amplificação da região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*.

FIGURA 3 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA O DOMÍNIO CENTRAL + C-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *A. brasilense*



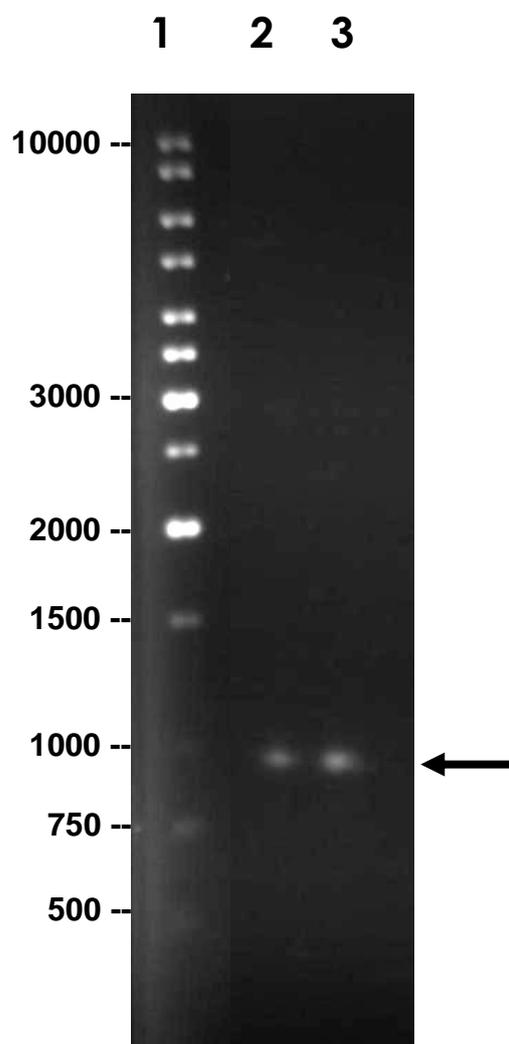
Linha 1 – Padrão de massa molecular 1 kb ladder; linhas 2 e 3 – Fragmento de DNA correspondendo à região que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*, com aproximadamente 1400 pares de bases. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta indica o fragmento obtido por PCR na amplificação da região que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*.

FIGURA 4 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA O DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *A. vinelandii*



Linha 1 – Padrão de massa molecular 1 kb ladder; linha 2 – Fragmento de DNA correspondendo à região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*, com aproximadamente 650 pares de bases. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta indica o fragmento obtido por PCR na amplificação da região que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*. O outro fragmento corresponde ao produto de amplificação não específica.

FIGURA 5 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CODIFICA PARA O DOMÍNIO CENTRAL + C-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA DE *A. vinelandii*



Linha 1 – Padrão de massa molecular 1 kb ladder; linhas 2 e 3 – Fragmento de DNA correspondendo à região que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*, com aproximadamente 1000 pares de bases. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta indica o fragmento obtido por PCR na amplificação da região que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*.

4.2 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDIOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQÜÊNCIAS CODIFICADORAS PARA OS DOMÍNIOS MODULARES DA PROTEÍNA NifA DE *A. brasilense* E *A. vinelandii*

As seqüências codificadoras para os domínios N-terminal e central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii* obtidas através de PCR foram clonadas e subclonadas em diferentes vetores.

Primeiramente, os produtos de PCR foram clonados no vetor pCR2.1 (Apêndice 1). O vetor pCR2.1 é um vetor de clonagem que possui um promotor *lac* e resistência aos antibióticos kanamicina e ampicilina, produzido pela Invitrogen. Este vetor possui, em seu sítio de policlonagem, extremidades de timina, que são complementares a extremidade de adeninas presente no produto de PCR, introduzido pela enzima Taq DNA polimerase ao final do processo de replicação do DNA. Assim, a ligação do produto de PCR ao vetor já linearizado não requer o uso de enzimas de restrição e pode ser feito logo após a amplificação das regiões de interesse. A clonagem dos produtos de PCR ao vetor pCR2.1 está descrito em Matérias e Métodos (item 3.9).

A análise dos produtos de ligação foi realizada através de reação de restrição com a enzima EcoRI, que possui dois sítios de restrição localizados na região de policlonagem do vetor.

Foram obtidos quatro diferentes plasmídios com perfil de restrição esperados correspondendo as regiões codificadoras para os domínios modulares da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii* (Figuras 6, 7, 8 e 9). Estes plasmídios foram totalmente sequenciados. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se os “primers” Reverso ou Universal que anelam ao vetor pCR2.1. As seqüências obtidas foram comparadas com o banco de dados GENBANK, apresentando 100% de identidade com o gene *nifA* de *A. brasilense* ou *A. vinelandii*, confirmando assim a clonagem no vetor pCR2.1.

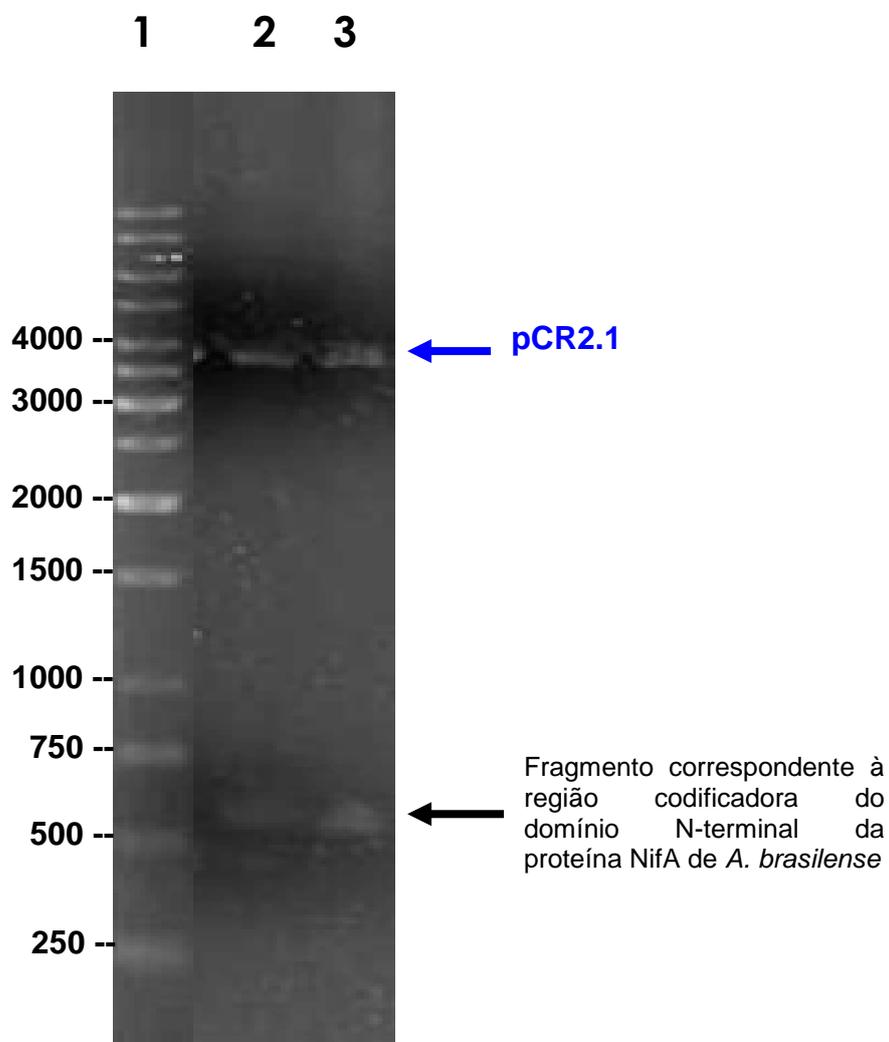
Os clones obtidos foram denominados pPSNAB-1 (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* clonada no vetor pCR2.1), pPSCAB-1 (contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* clonada no vetor pCR2.1), pPSNAV-1

(contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* clonada no vetor pCR2.1) e pPSCAV-1 (contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* clonada no vetor pCR2.1).

O DNA plasmidial de cada um dos clones obtidos foi extraído e submetido a uma reação de restrição com as enzimas de restrição XbaI e HindIII a fim de liberar o inserto correspondente às regiões de interesse. Os fragmentos resultantes da reação de restrição foram ligados ao vetor de expressão pDK7 (Apêndice 2) (Figura 10). Este vetor possui um promotor *tac* e resistência ao antibiótico cloranfenicol. Pela diferença na resistência ao antibiótico, o vetor pDK7 foi escolhido para a subclonagem das regiões que codificam os domínios modulares da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii*. Desse modo, seria possível a posterior montagem dos genes que codificam para as proteínas quiméricas NifAQ1Ab e NifAQ2Ab no vetor de expressão pET28a (Apêndice 3). O vetor pET28a possui promotor T7 e um gene de resistência ao antibiótico kanamicina. Se a montagem dos genes quiméricos fosse realizada diretamente do vetor pCR2.1 para o vetor pET28a, não seria possível a seleção dos clones de interesse por todos serem resistentes ao mesmo antibiótico. O vetor pDK7 também foi clivado com as enzimas de restrição XbaI e HindIII. Após a digestão, vetor e DNA inserto foram ligados como descrito em Materiais e Métodos (item 3.11). Foram analisados 18 clones através de reação de restrição com as enzimas de restrição XbaI e HindIII. Os padrões de restrição esperados foram confirmados em 10 clones, sendo que 1 apresentou um fragmento de 750 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* mais uma porção relativa à região de policlonagem do vetor pDK7 (Figura 11). Outros 2 clones apresentaram um fragmento de 1500 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* mais a região de policlonagem do vetor pDK7 (Figura 12); 2 apresentaram um fragmento de 750 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* mais a porção do vetor pDK7 (Figura 13) e 5 apresentaram um fragmento de 1200 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* mais a

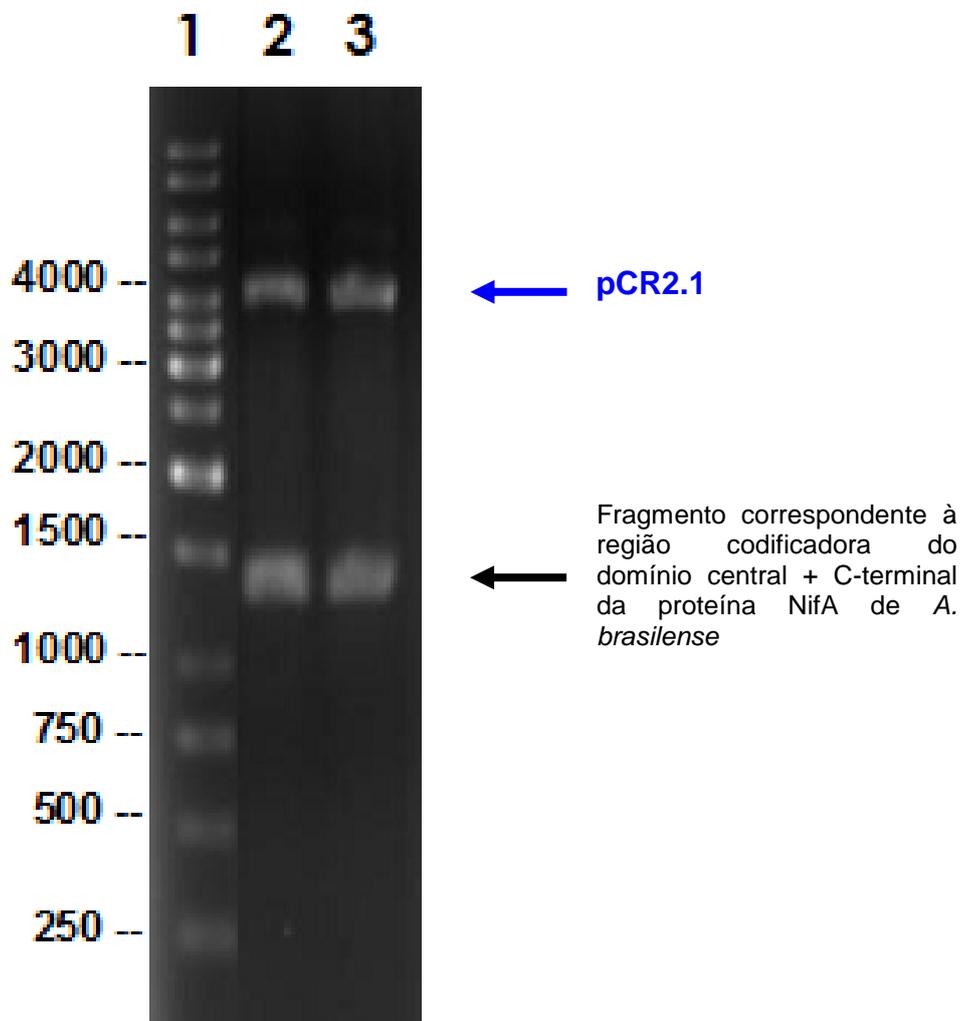
região de policlonagem do vetor pDK7 (Figura 11). Estes plasmídios foram, então, denominados pPSNAB-2 (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* clonada no vetor pDK7), pPSCAB-2 (contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* clonada no vetor pDK7), pPSNAV-2 (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* clonada no vetor pDK7) e pPSCAV-2 (contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* clonada no vetor pDK7).

FIGURA 6 – PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAB-1 DIGERIDO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO EcoRI



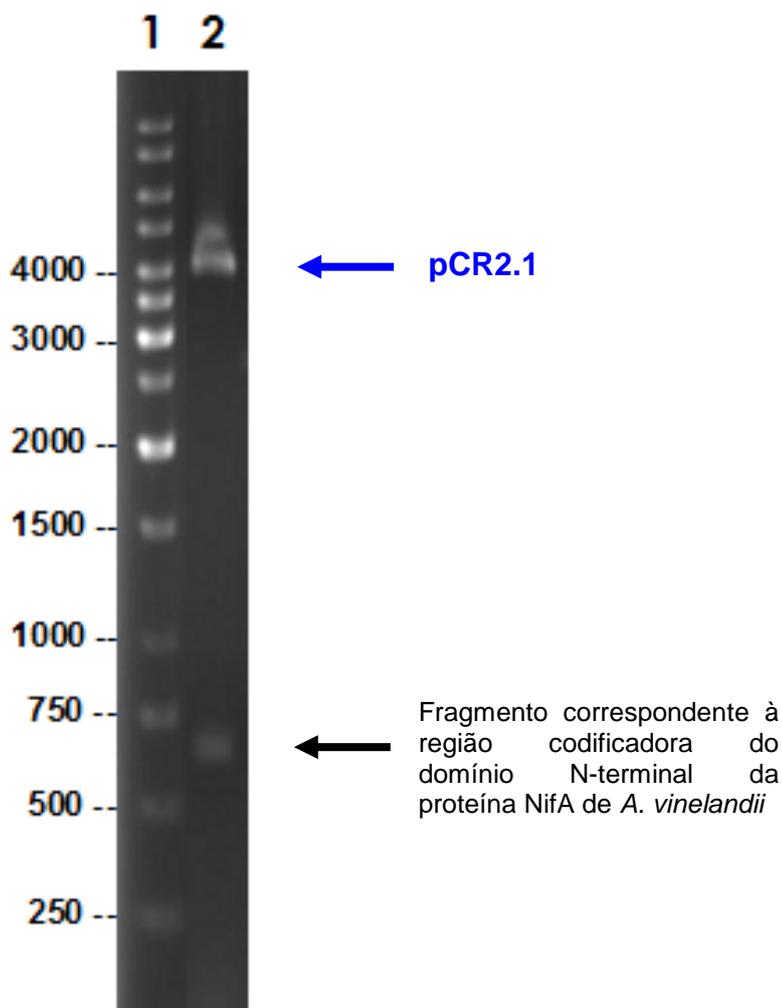
Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder; linha 2 e 3 – Padrão eletroforético da reação de restrição com a enzima EcoRI dos plasmídios recombinantes obtidos com a ligação do produto de PCR correspondente à região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ao vetor pCR2.1. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em preto indica o fragmento correspondente à região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*, com, aproximadamente, 600 pares de bases e a seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pCR2.1 linearizado, de 3,9 kb.

FIGURA 7 – PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSCAB-1 DIGERIDO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO EcoRI



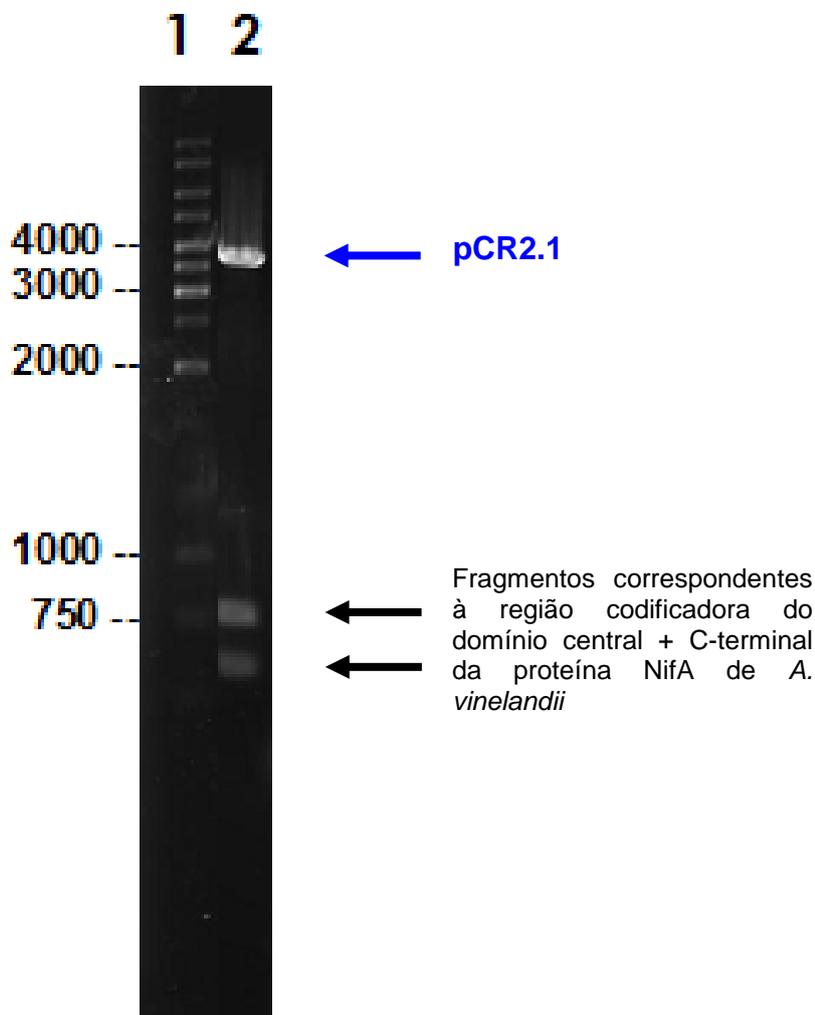
Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder; linha 2 - 3 – Padrão eletroforético da reação de restrição com a enzima EcoRI dos plasmídios recombinantes obtidos com a ligação do produto de PCR correspondente à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ao vetor pCR2.1. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em preto indica o fragmento correspondente à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*, com, aproximadamente, 1400 pares de bases e a seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pCR2.1 linearizado, de 3,9 kb.

FIGURA 8 – PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAV-1 DIGERIDO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO EcoRI



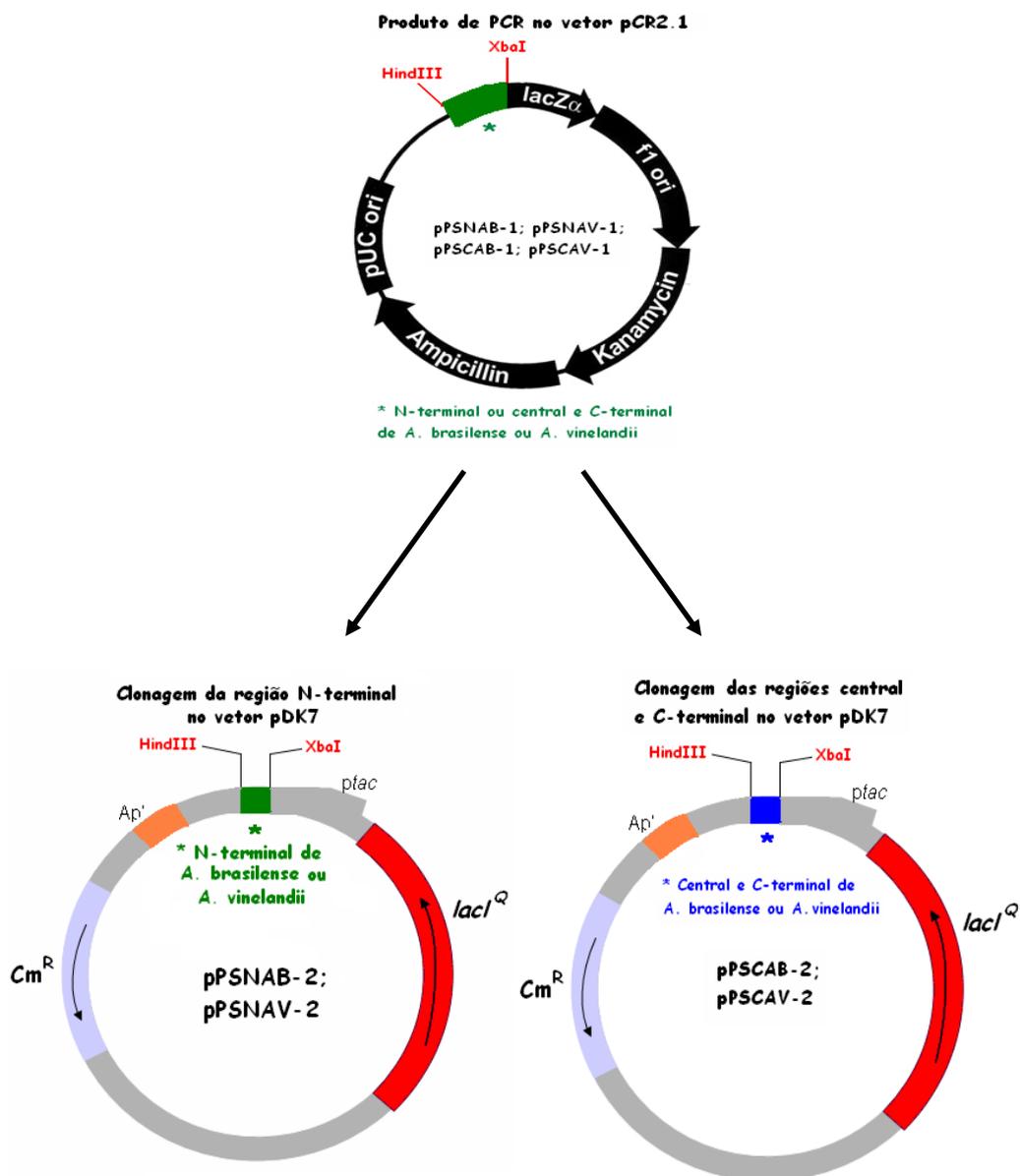
Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder; linha 2 – Padrão eletroforético da reação de restrição com a enzima EcoRI do plasmídeo recombinante obtido com a ligação do produto de PCR correspondente à região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ao vetor pCR2.1. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em preto indica o fragmento correspondente à região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*, com, aproximadamente, 650 pares de bases e a seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pCR2.1 linearizado, de 3,9 kb.

FIGURA 9 – PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSCAV-1 DIGERIDO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO EcoRI



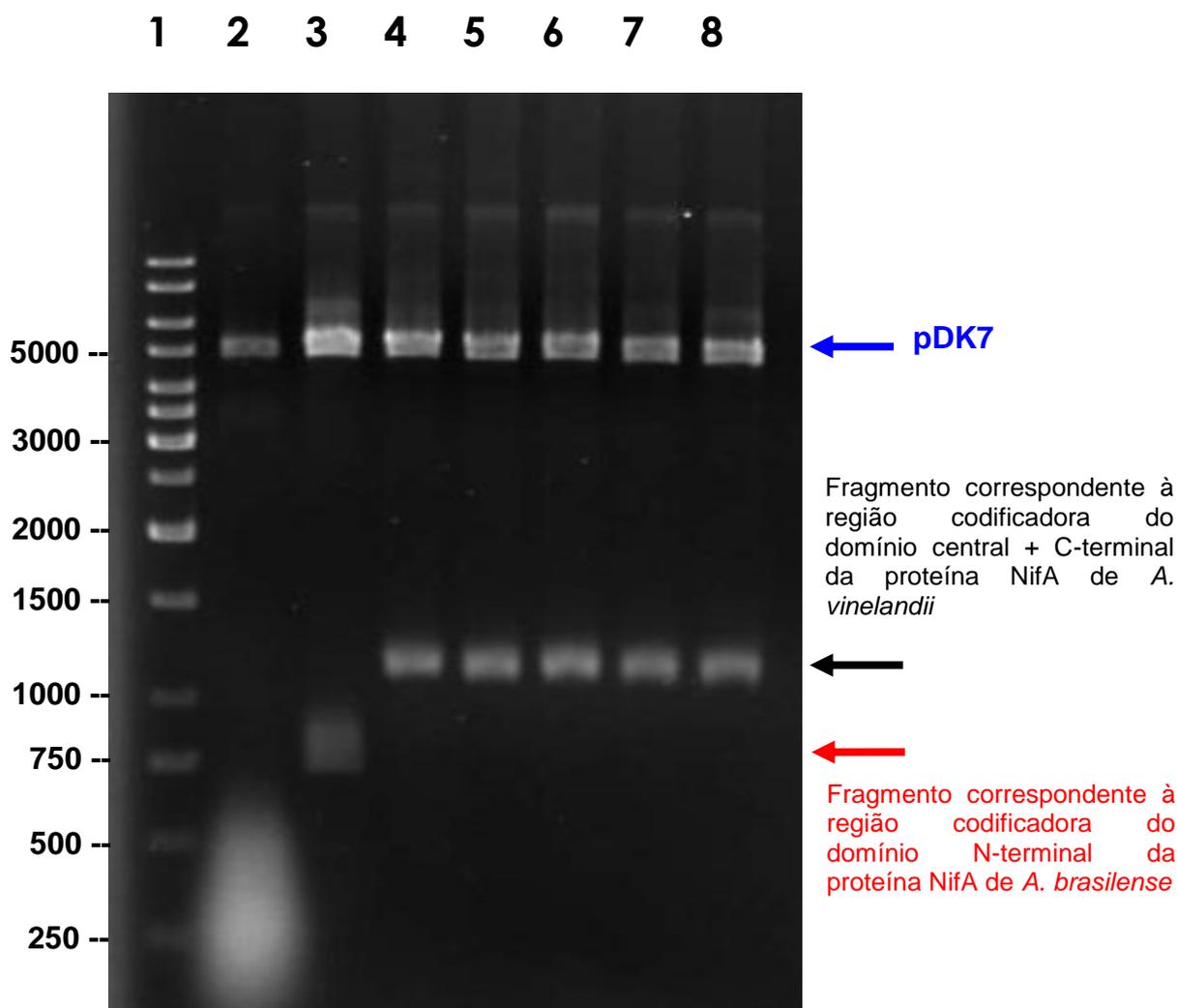
Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder; linha 2 – Padrão eletroforético da reação de restrição com a enzima EcoRI do plasmídeo recombinante obtido com a ligação do produto de PCR correspondente à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ao vetor pCR2.1. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. As setas em preto indicam os dois fragmentos que correspondem à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*, com aproximadamente 1000 pares de bases. A obtenção dos dois fragmentos foi devido a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* possuir um sítio de restrição para a enzima EcoRI na posição 1192. A seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pCR2.1 linearizado, de 3,9 kb.

FIGURA 10 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS PARA OS DOMÍNIOS MODULARES DA PROTEÍNA NifA DE *A. brasilense* E *A. vinelandii*



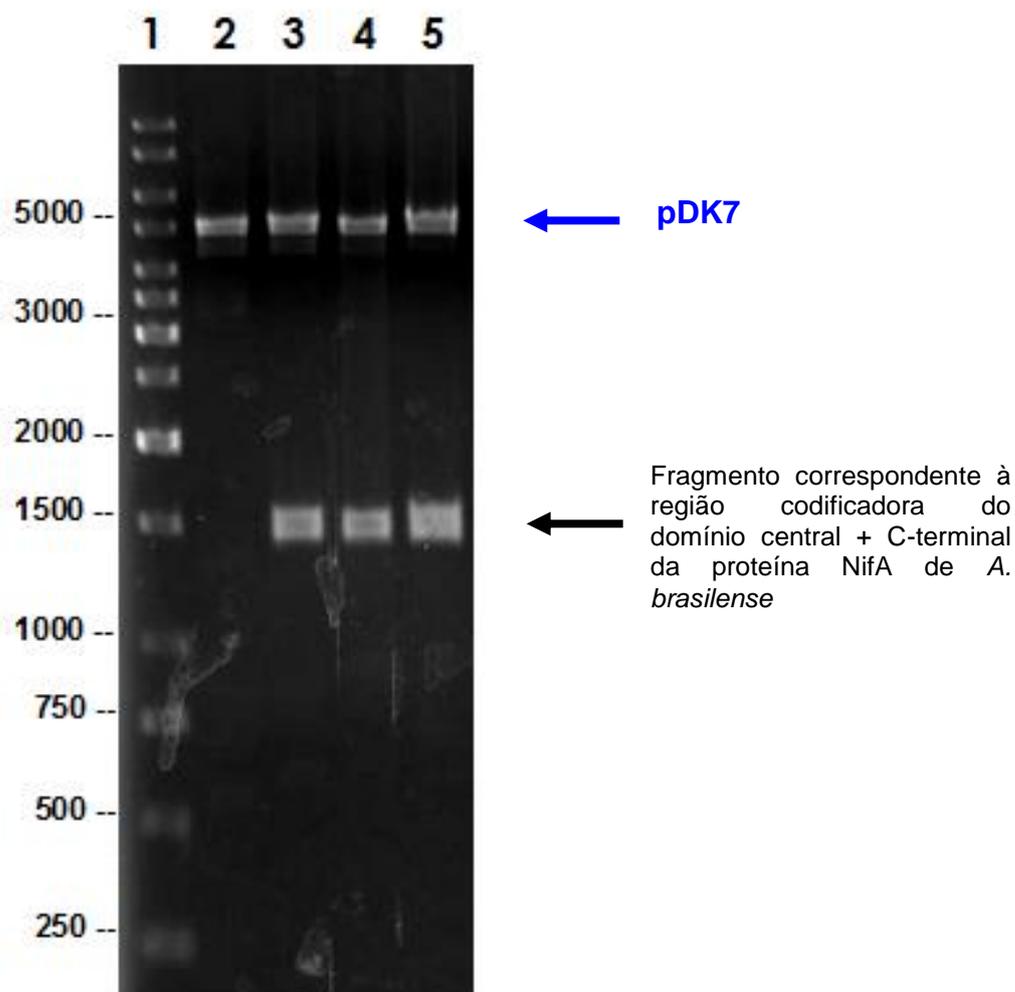
Os plasmídios pPSNAB-1, pPSNAV-1, pCAB-1 e pPSCAV-1 foram digeridos com as enzimas HindIII e XbaI para que fossem liberados os fragmentos que codificam para os domínios N-terminal e central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii*. Estes fragmentos, então, foram ligados ao vetor pDK7, originando os plasmídios **pPSNAB-2** (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*), **pPSNAV-2** (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*), **pPSCAB-2** (contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*) e **pPSCAV-2** (contém a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*).

FIGURA 11 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAB-2 e pPSCAV-2 DIGERIDOS COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E HindIII



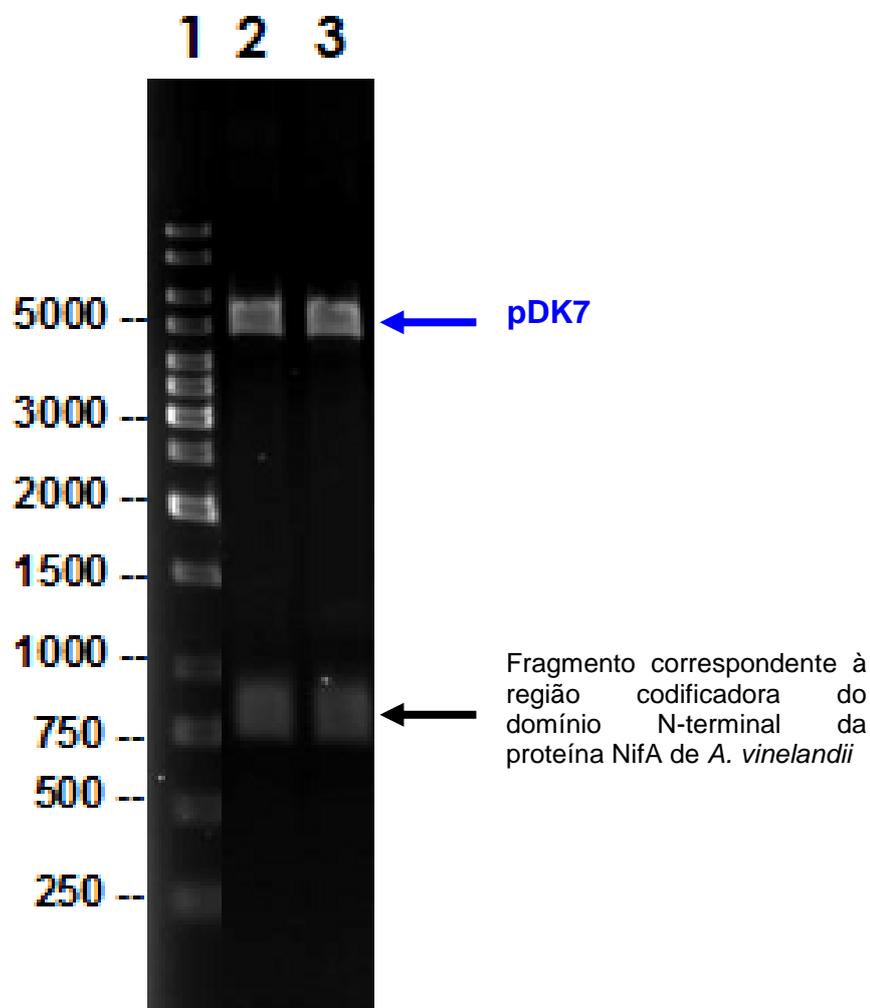
Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder. Linha 2 – Padrão eletroforético da reação de restrição do vetor pDK7 com as enzimas XbaI e HindIII (controle). Linha 3 – Padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas XbaI e HindIII do plasmídeo recombinante obtido com a ligação do fragmento correspondente à região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ao vetor pDK7. Linhas 4 – 8 – Padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas XbaI e HindIII dos plasmídios recombinantes obtidos com a ligação do fragmento correspondente à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em vermelho indica o fragmento de 750 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* mais uma porção relativa à região de policlonagem do vetor pDK7. A seta em preto indica o fragmento de 1200 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* mais a região do vetor pDK7. A seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pDK7 linearizado, de 4,8 kb.

FIGURA 12 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSCAB-2 DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E HindIII



Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder; linha 2 – Padrão eletroforético da reação de restrição do vetor pDK7 com as enzimas XbaI e HindIII (controle). Linha 3 - 5 – Padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas XbaI e HindIII dos plasmídios recombinantes obtidos com a ligação do fragmento correspondente à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ao vetor pDK7. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em preto indica o fragmento de 1500 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* mais uma porção relativa à região do vetor pDK7. A seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pDK7 linearizado, de 4,8 kb.

FIGURA 13 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAV-2 DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E HindIII



Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder; linha 2 - 7 – Padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas XbaI e HindIII dos plasmídios recombinantes obtidos com a ligação do fragmento correspondente à região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ao vetor pDK7. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em preto indica o fragmento de 750 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* mais uma porção relativa à região do vetor pDK7. A seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pDK7 linearizado, de 4,8 kb.

4.3 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS RECOMBINANTES CONTENDO OS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS NifAQ1Ab E NifAQ2Ab

Com o objetivo de melhor estudar o mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA de *Azospirillum brasilense* foram construídos dois genes quiméricos, *nifAQ1Ab*, que codifica o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ligado ao domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* e *nifAQ2Ab*, que codifica o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ligado ao domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*. Através da construção de plasmídios contendo estes genes quiméricos, será possível fazer a expressão das proteínas quiméricas e utilizá-las para posteriores estudos *in vivo* e *in vitro*, que elucidem o mecanismo de regulação da proteína NifA de *Azospirillum brasilense*.

Para a construção dos genes quiméricos, as regiões que codificam os domínios modulares da proteína NifA foram amplificadas por PCR, ligadas ao vetor pCR2.1, subclonadas no vetor pDK7 e, em seguida, a ligação dos genes quiméricos foi realizada no vetor pET28a (Figura 14). O vetor pET28a é um vetor de expressão, que possui um promotor do tipo T7, reconhecido pela RNA polimerase do fago T7, proporcionando uma alta taxa de expressão da proteína de interesse. O vetor pET28a origina uma proteína de fusão com um oligopeptídeo de 24 aminoácidos contendo seis resíduos de histidina em seqüência (His-tag) ligados à proteína de interesse. Esta proteína de fusão pode ser purificada utilizando uma resina contendo metais, como, por exemplo, níquel. O sistema é baseado na formação de um complexo entre os resíduos de histidina da proteína de fusão ao metal imobilizado na resina.

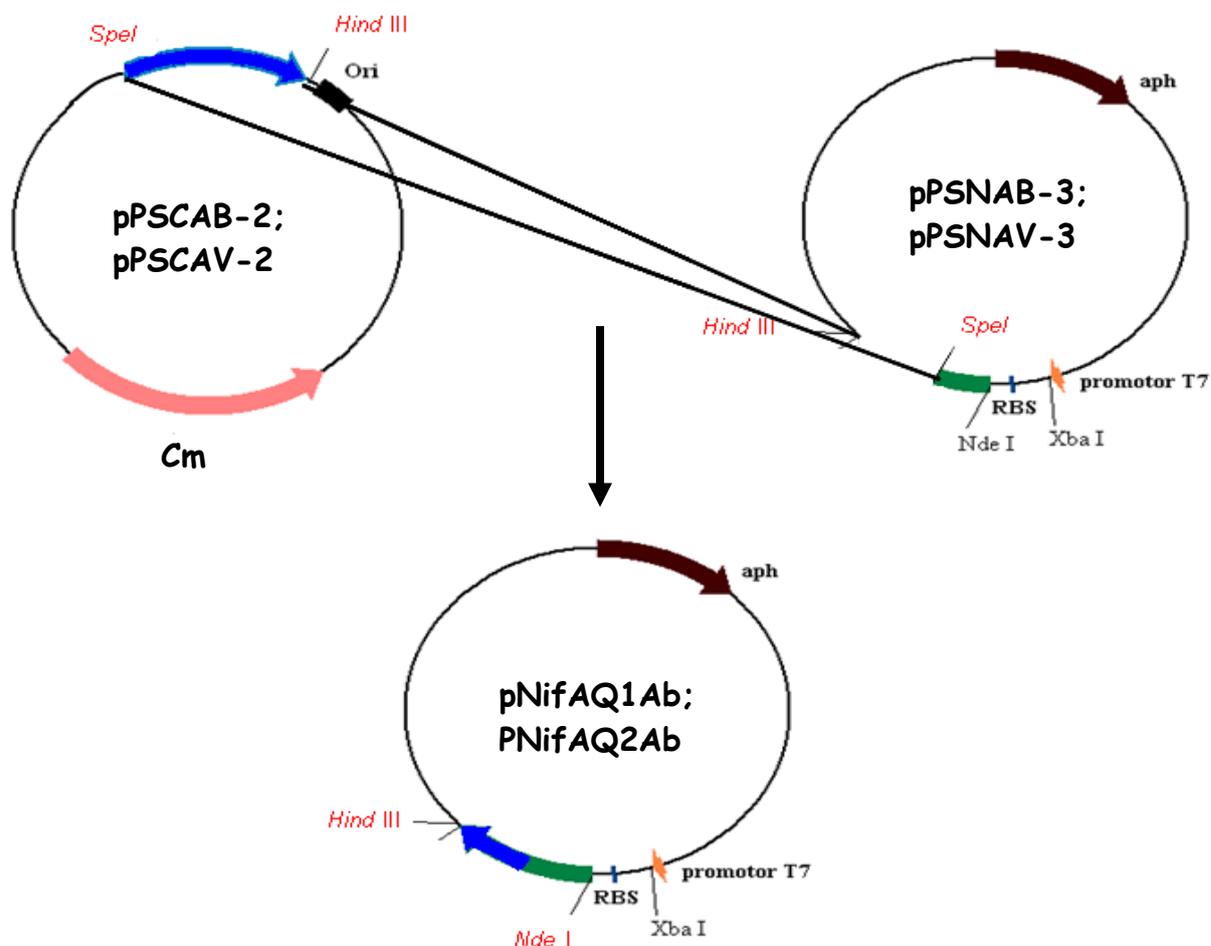
Inicialmente, os plasmídios pPSNAB-2 (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA clonada no vetor pDK7) e pPSNAV-2 (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA clonada no vetor pDK7) foram utilizados para uma reação de restrição com as enzimas NdeI e BamHI e NdeI e HindIII, respectivamente. O vetor pET28a também foi clivado com as mesmas enzimas de restrição, NdeI, BamHI e HindIII. Após a digestão, vetor e DNA insertos

foram ligados como descrito em Materiais e Métodos (item 3.10 e 3.11). Foram analisadas 11 clones através de reação de restrição com as enzimas de restrição XbaI e XhoI. Os padrões de restrição esperados foram confirmados em 2 clones, sendo que 1 apresentou um fragmento de aproximadamente 750 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* mais uma porção relativa à região de policlonagem do vetor pET28a (Figura 15); o outro clone apresentou também um fragmento de 750 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* (Figura 16). Estes plasmídios foram denominados pPSNAB-3 (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* clonada no vetor pET28a) e pPSNAV-3 (contém a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* clonada no vetor pET28a).

Os plasmídios pPSCAV-2 e pPSCAB-2, juntamente com os plasmídios obtidos pPSNAB-3 e pPSNAV-3, foram utilizados para uma nova reação de restrição com as enzimas SpeI e BamHI para que fossem liberados os fragmentos que codificam para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii*. Estes fragmentos foram então ligados aos plasmídios pPSNAB-3 e pPSNAV-3, originando os genes quiméricos *nifAQ1Ab* (ligação do fragmento que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ao plasmídio pPSNAB-3) e *nifAQ2Ab* (ligação do fragmento que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ao plasmídio pPSNAV-3). Foram analisados 27 clones através de reação de restrição com as enzimas XbaI e XhoI. O padrão de restrição esperado para o gene quimérico *nifAQ1Ab* foi obtido em 3 clones (Figura 17), que apresentaram uma banda de 5400 pares de bases, correspondente ao tamanho esperado para o vetor pET28a linearizado e outra banda de, aproximadamente, 1500 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ligada à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*. Já o padrão de restrição esperado para o gene quimérico *nifAQ2Ab* foi obtido nos 15 clones analisados (Figura 18), que apresentaram uma banda de 5400 pares de bases, correspondente ao tamanho esperado para o vetor pET28a e outras duas bandas de aproximadamente 750 e 1300 pares de bases.

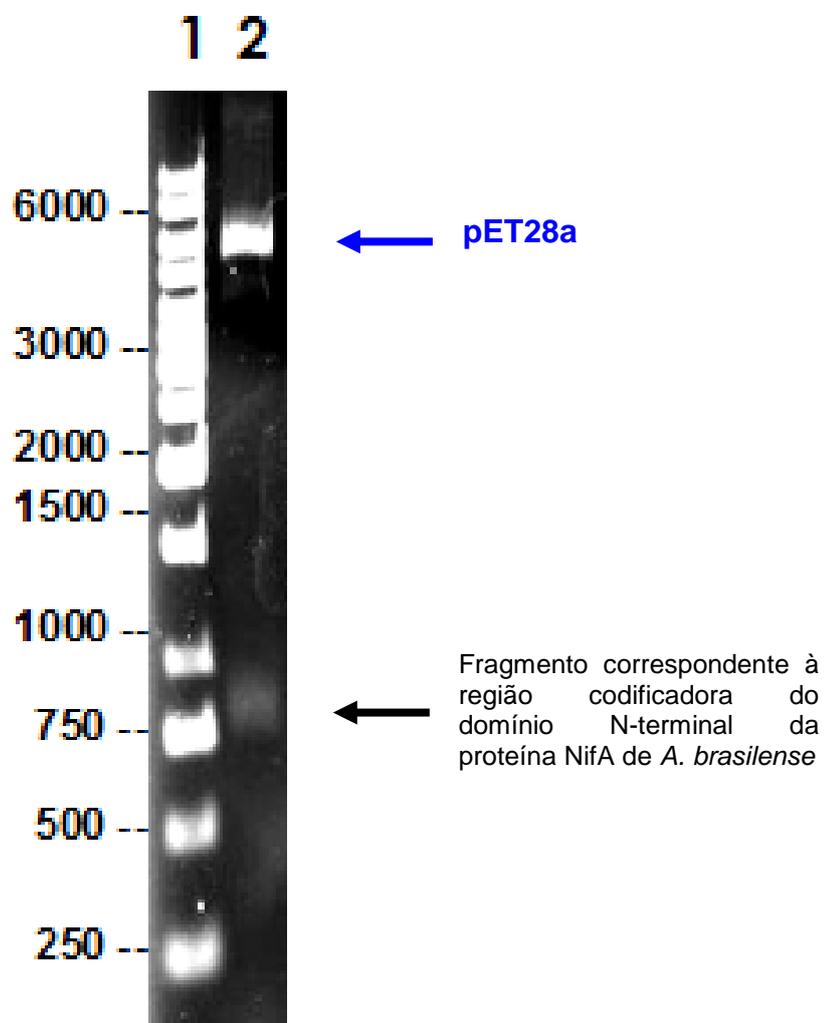
Neste caso foram obtidas duas bandas pelo fato da região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* apresentar um sítio de restrição para a enzima XhoI na posição 838. O valor somado das duas bandas corresponde ao tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ligada à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*.

FIGURA 14 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS pNifAQ1Ab e pNifAQ2Ab



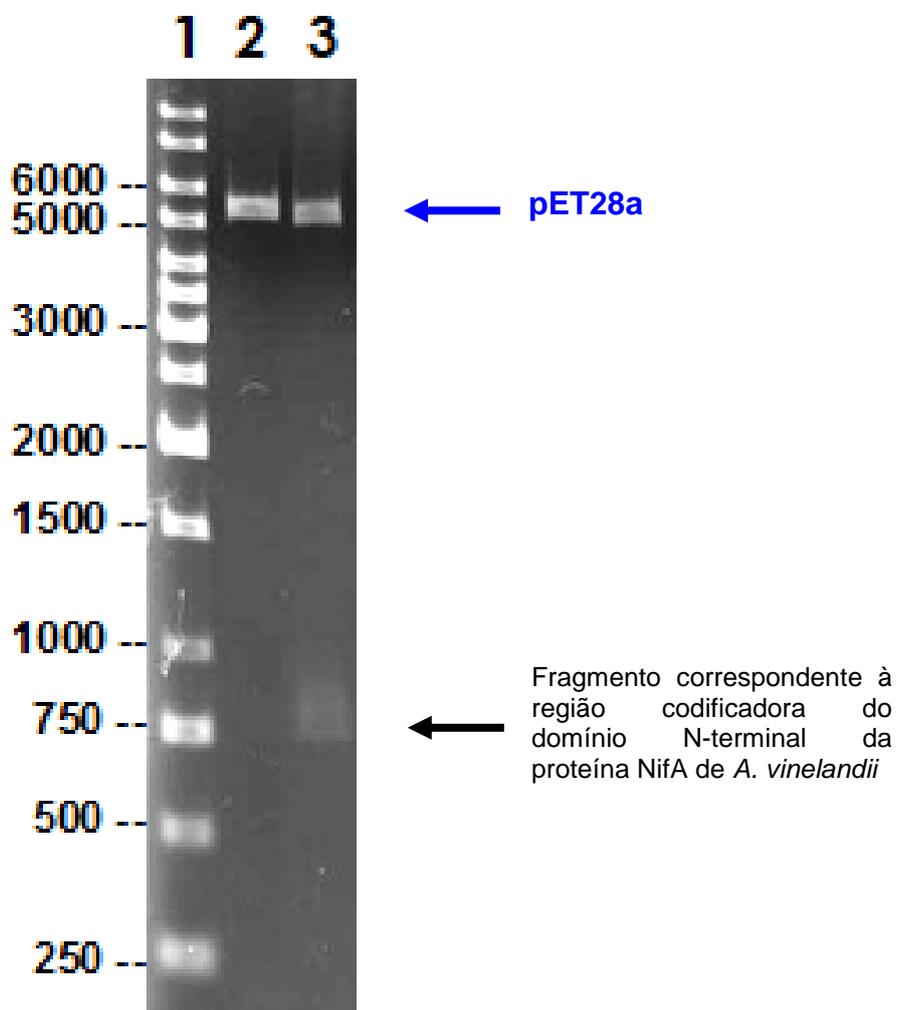
Os plasmídios pPSCAV-2 e pPSCAB-2, juntamente com os plasmídios obtidos pPSNAB-3 e pPSNAV-3, foram digeridos com as enzimas SpeI e BamHI para que fossem liberados os fragmentos que codificam para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii*. Estes fragmentos, então, foram ligados aos plasmídios pPSNAB-3 e pPSNAV-3, originando os genes quiméricos *nifAQ1Ab* (ligação do fragmento que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ao plasmídio pPSNAB-3) e *nifAQ2Ab* (ligação do fragmento que codifica para o domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ao plasmídio pPSNAV-3). Os clones contendo os genes quiméricos foram denominados pNifAQ1Ab e pNifAQ2Ab.

FIGURA 15 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAB-3 DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E XhoI



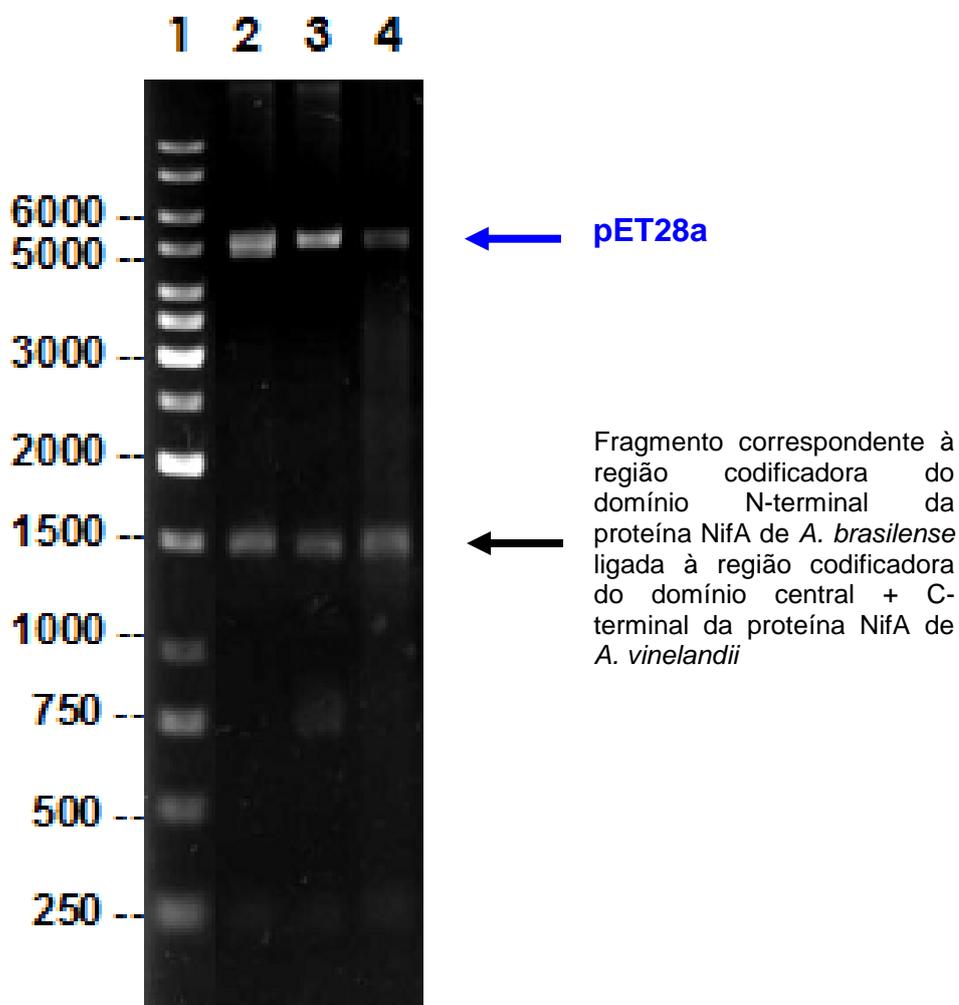
Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder. Linha 2 – Padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas XbaI e XhoI do plasmídeo recombinante obtido com a ligação do fragmento correspondente à região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ao vetor pET28a. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em preto indica o fragmento de 750 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* mais uma porção relativa à região de policlonagem do vetor pET28a. A seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pET28 linearizado, de 5,4 kb.

FIGURA 16 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pPSNAV-3 DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E XhoI



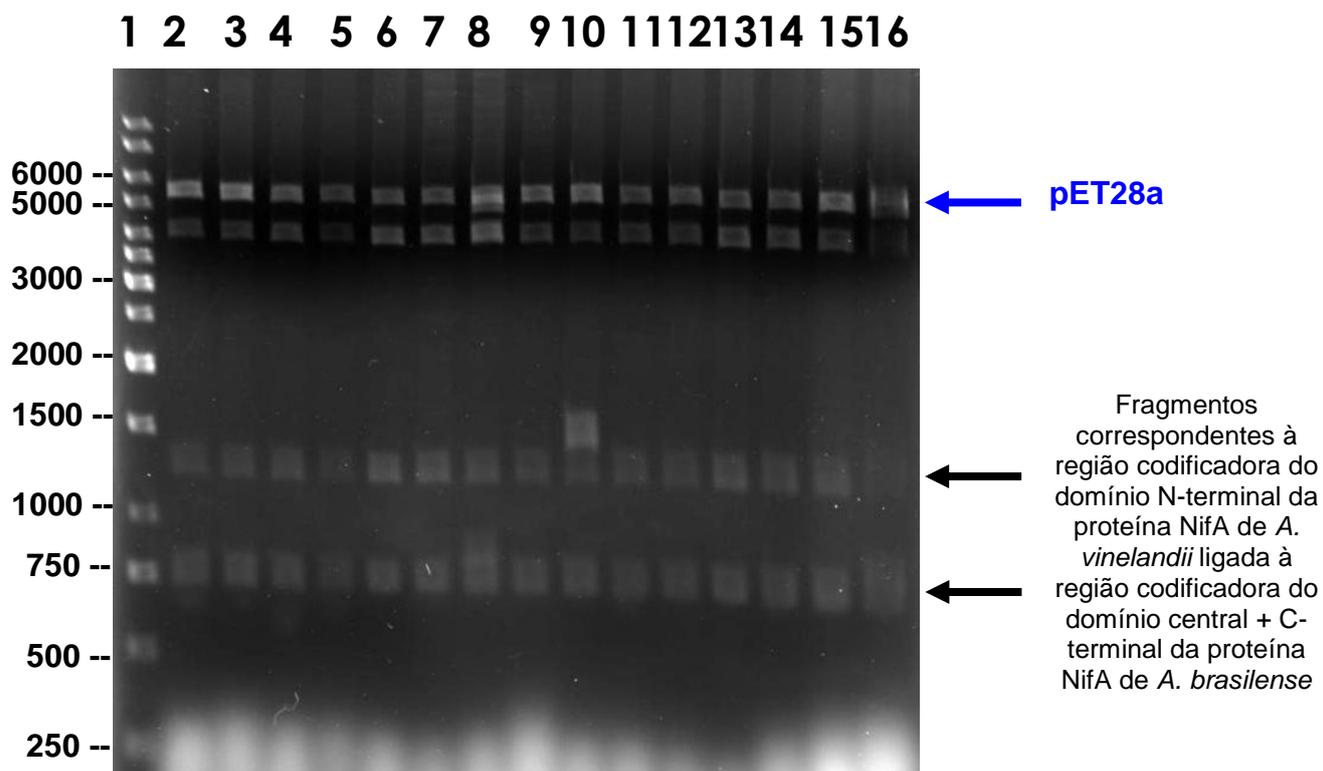
Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder. Linha 2 - Padrão eletroforético da reação de restrição do vetor pET28a com as enzimas XbaI e XhoI (controle). Linhas 3 – Padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas XbaI e XhoI do plasmídeo recombinante obtido com a ligação do fragmento correspondente à região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ao vetor pET28a. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em preto indica o fragmento de 750 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* mais uma porção relativa à região do vetor pET28a. A seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pET28 linearizado, de 5,4 kb.

FIGURA 17 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pNifAQ1Ab DIGERIDO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E XhoI



Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder. Linhas 2 - 4 – Padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas XbaI e XhoI dos plasmídios recombinantes obtidos com a ligação do fragmento correspondente à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* ao plasmídio pPSNAB-3. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta em preto indica o fragmento de, aproximadamente, 1500 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ligada à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*. A seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pET28 linearizado, de 5,4 kb.

FIGURA 18 - PERFIL DO PADRÃO DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDIO pNifAQ2Ab CORTADO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO XbaI E XhoI



Linha 1 – Marcador de peso molecular 1 kb ladder. Linhas 2 - 16 – Padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas XbaI e XhoI dos plasmídios recombinantes obtidos com a ligação do fragmento correspondente à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ao plasmídio pPSNAV-3. A figura mostra eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. As duas setas em preto indicam os fragmentos de, aproximadamente, 750 e 1300 pares de bases, tamanho esperado para a região codificadora do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ligada à região codificadora do domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*. A seta em azul indica o fragmento que corresponde ao tamanho do vetor pET28 linearizado, de 5,4 kb.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA NifAQ1Ab

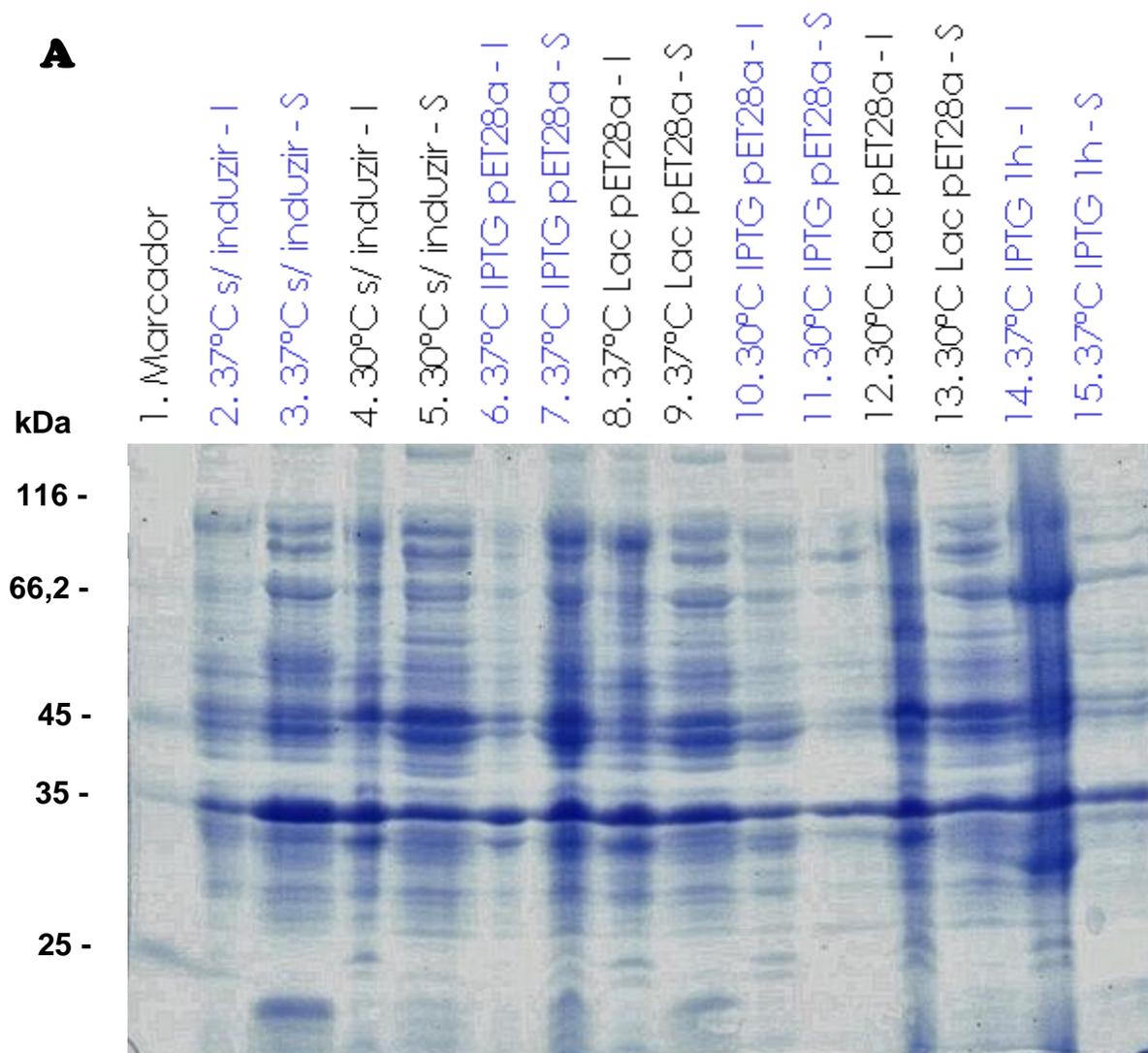
A confirmação da montagem do gene quimérico *nifAQ1Ab* foi realizada através da expressão da proteína quimérica NifAQ1Ab a partir do vetor pET28a. Para que ocorra a expressão, é necessário que a bactéria hospedeira produza a RNA polimerase do fago T7. A linhagem de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* na presença de um indutor, como IPTG ou lactose, é capaz de expressar esta enzima. A figura 19 mostra que a estirpe de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* contendo o plasmídio pNifAQ1Ab foi capaz de superexpressar uma proteína de, aproximadamente, 66 kDa, que não está presente no extrato celular dos transformantes contendo somente o vetor pET28a. Esta proteína superexpressa corresponde ao tamanho esperado da proteína quimérica NifAQ1Ab ligada a cauda de histidina, mostrando dessa forma que os clones obtidos são capazes de superexpressar o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* ligado ao domínio central + C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii*.

Foi verificado que a proteína superexpressa se apresenta predominantemente na fração insolúvel do extrato celular. Para determinar as condições ótimas de indução da proteína quimérica NifAQ1Ab a fim de obter uma máxima solubilidade e quantidade de proteína, foram realizados vários ensaios de expressão. Os parâmetros testados foram: agente indutor (IPTG 0,5mmol/L ou lactose 0,5%), tempo de indução (1 a 4 horas e durante a noite) e temperatura (37°C, 30°C e 18°C). Os resultados podem ser visualizados na figura 19.

A expressão realizada a 37°C, tanto com IPTG, como com lactose, a partir de 2 horas de indução, resultaram em maior quantidade de proteína expressa (Figura 19-B e C). A maior quantidade de proteína foi obtida com a indução com IPTG por 3 horas (Figura 19-C). Houve também significativa expressão da proteína na condição de indução a 18°C durante a noite com IPTG e lactose (Figura 19-D). No entanto, a diminuição da temperatura de indução não resultou em significativa melhora da solubilidade da proteína. A quantidade de proteína obtida na fração

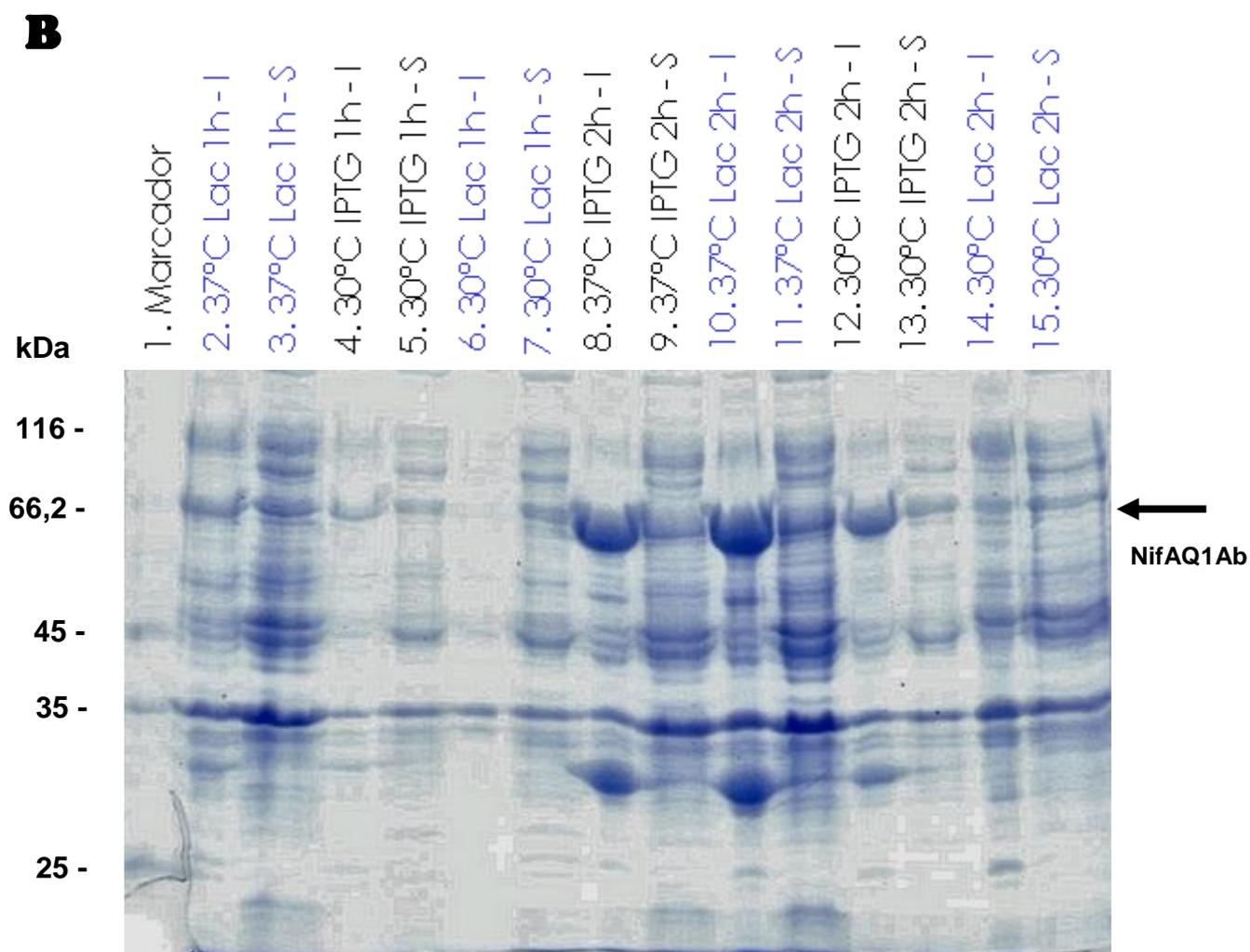
solúvel, apesar de pequena, já se mostra significativa para uma possível purificação através de cromatografia de afinidade em uma coluna de níquel.

FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA NifAQ1Ab EXPRESSA EM *E. coli* A PARTIR DO PLASMÍDIO pNifAQ1Ab EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO



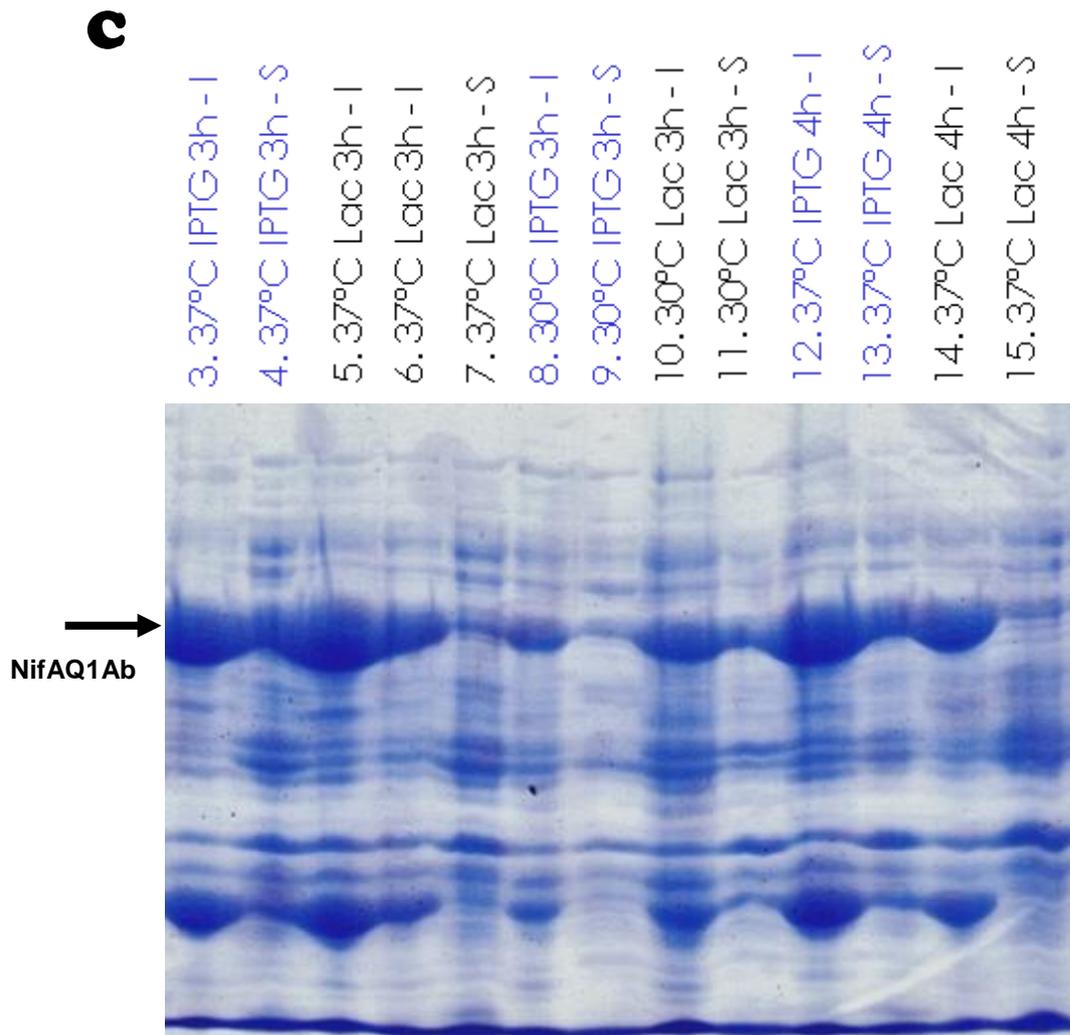
Legenda: **Marcador** = marcador de peso molecular (kDa); **37°C** = Indução a 37°C; **30°C** = Indução a 30°C; **IPTG** = Indução com IPTG 0,5mmol/L; **Lac** = Indução com lactose 0,5%; **s/ induzir** = sem agente indutor; **1h** = Indução por 1 hora; **I** = fração insolúvel do extrato celular; **S** = fração solúvel do extrato celular.

O painel A mostra eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10% corado com coomassie blue. Linha 2-5 e 14-15 - Extrato celular de bactérias *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pNifAQ1Ab. Linhas 6-13 - Extrato celular de bactérias *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o vetor pET28a e induzidas por 3 horas.



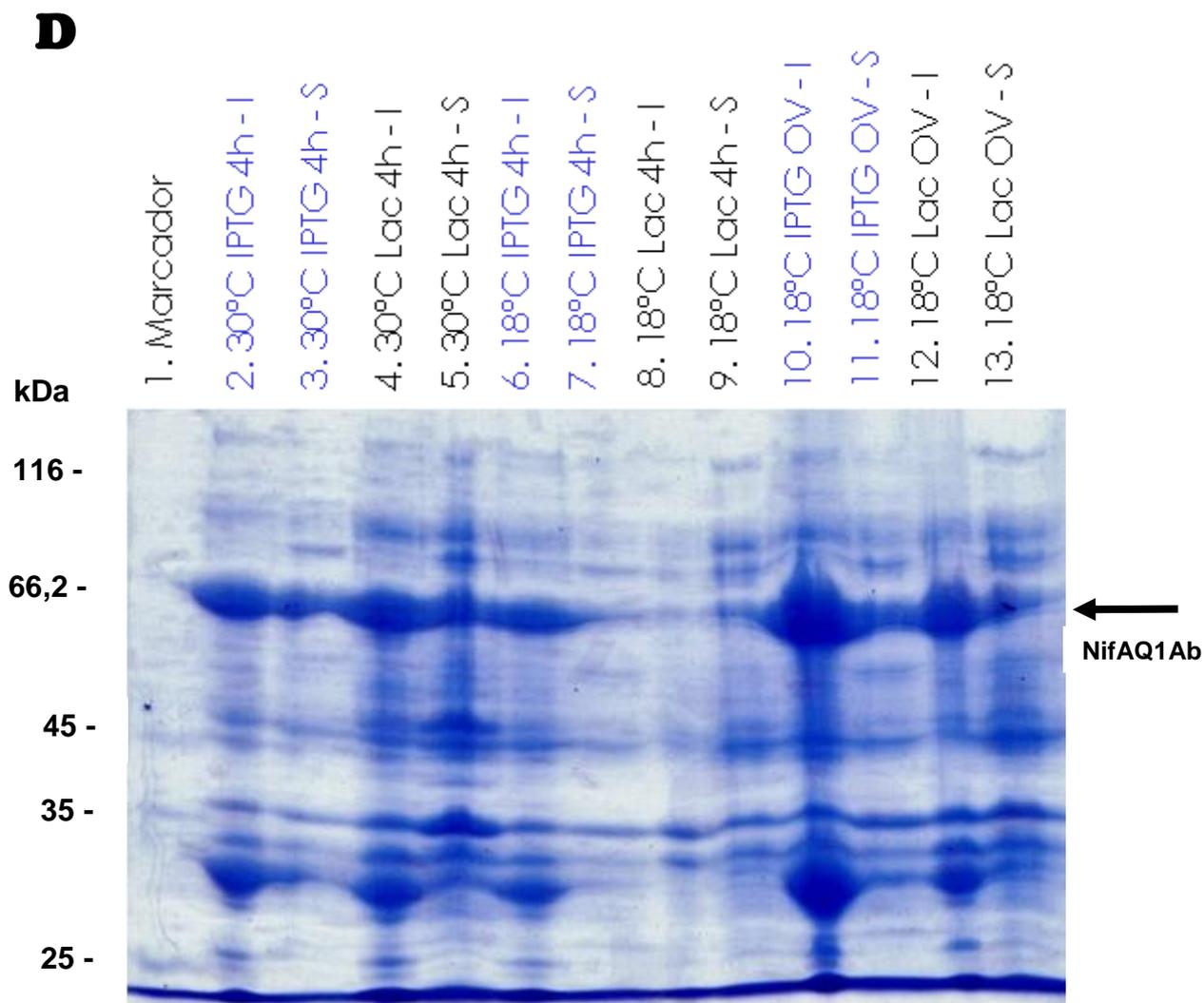
Legenda: **Marcador** = marcador de peso molecular (kDa); **37°C** = Indução a 37°C; **30°C** = Indução a 30°C; **IPTG** = Indução com IPTG 0,5mmol/L; **Lac** = Indução com lactose 0,5%; **1h** = Indução por 1 hora; **2h** = Indução por 2 horas; **I** = fração insolúvel do extrato celular; **S** = fração solúvel do extrato celular.

O painel B mostra eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10% corado com coomassie blue. Linhas 2-15 - Extrato celular de bactérias *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pNifAQ1Ab. A seta indica a proteína quimérica NifAQ1Ab superexpressa com, aproximadamente, 66 kDa.



Legenda: **37°C** = Indução a 37°C; **30°C** = Indução a 30°C; **IPTG** = Indução com IPTG 0,5mmol/L; **Lac** = Indução com lactose 0,5%; **3h** = Indução por 3 horas; **4h** = Indução por 4 horas; **I** = fração insolúvel do extrato celular; **S** = fração solúvel do extrato celular.

O painel C mostra eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10% corado com coomassie blue. Linhas 3-15 - Extrato celular de bactérias *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pNifAQ1Ab. A seta indica a proteína quimérica NifAQ1Ab superexpressa com, aproximadamente, 66 kDa.



Legenda: **Marcador** = marcador de peso molecular (kDa); **30°C** = Indução a 30°C; **18°C** = Indução a 18°C; **IPTG** = Indução com IPTG 0,5mmol/L; **Lac** = Indução com lactose 0,5%; **4h** = Indução por 4 horas; **OV** = Indução durante a noite; **I** = fração insolúvel do extrato celular; **S** = fração solúvel do extrato celular.

O painel D mostra eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10% corado com coomassie blue. Linhas 2-15 - Extrato celular de bactérias *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pNifAQ1Ab. A seta indica a proteína quimérica NifAQ1Ab superexpressa com, aproximadamente, 66 kDa.

5 CONCLUSÕES

- As regiões codificadoras dos domínios N-terminal e central + C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *A. vinelandii* foram obtidas com sucesso por PCR.
- Os produtos de PCR obtidos foram clonados no vetor pCR2.1 e totalmente sequenciados. As sequências obtidas foram 100% idênticas a do gene *nifA* de *A. brasilense* ou *A. vinelandii*.
- O gene quimérico *nifAQ1Ab* foi construído com sucesso no vetor pET28a e a expressão da proteína quimérica NifAQ1Ab em *E. coli* foi confirmada através de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e análise por MALDI-TOF.
- A proteína quimérica NifAQ1Ab superexpressa encontrava-se quase que totalmente na fração insolúvel do extrato celular da estirpe de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* transformada com o plasmídeo pNifAQ1Ab nas condições testadas.
- Os maiores níveis de expressão de NifAQ1Ab foram obtidos após indução a 37°C a partir de 2 horas ou a 18°C durante a noite, utilizando IPTG 0,5mmol/L ou lactose 0,5% como indutores.

6 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. **Nucl. Acids Res.**, v.25, p. 3389-3402, 1997.

ARAUJO, L.M.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 491-495, 2004.

ARAVIND, L.; PONTING, C. P. The GAF domain: na evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v.12, p.458-9, 1997.

ARSÉNE, 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.**, v.178, p.4830-4838, 1996.

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

AUSTIN, S.; BUCK, M.; CANNON, W.; EYDMANN, T.; DIXON, R. Purification and *in vitro* activities of the native nitrogen fixation control proteins NifA and NifL. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 3460-3465, 1994.

AUSTIN, S.; HENDERSON, N.; DIXON, R. Characterisation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NifA and NifL *in vitro*. **Eur. J. Biochem.**, v.187, p.353-360, 1990.

BUCK, M.; WOODCOCK, J.; CANNON, W.; MITCHENALL, L.; DRUMMOND, M. Positional requirements for the function of *nif*-specific upstream activator sequences. **Mol. Gen. Genet.**, v.210, p.140-144, 1987.

CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M.; BALI, A.; BLANCO, G.; GARCIA, E.; BUSH, G.; KENNEDY, C.; MERRICK, M. The product of the nitrogen fixation regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 24, p. 7741-9, 1991.

DEAN, D.R.; JACOBSEN, M. R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p.763-834, 1992.

DITTA, G.; VIRTS, E.; PALOMARES, A.; CHOONG-HYUN, K. The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. **J. Bacteriol**, v. 169, p. 3217-3223, 1987.

DIXON, R.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; HILL, S. O.; MACHEROUX, P.; POOLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; SOBZCYK, A.; SODERBACK, E. Regulation of *nif* gene expression in free-living diazotrophs: recent advances. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W. (eds.). **Biological nitrogen fixation in the 21st century**. Kluwer Academic, p. 87-92, 1997.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews**, v.2, p.621-631, 2004.

FADEL-PICHETH, C. M.; 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, n.2, p.281-8, 1999.

FISCHER, H. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 152-386, 1994.

FISCHER, H. M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucl. Acids Res.**, v. 16, p. 2207-2224, 1988.

FISCHER, H.; FRITSCH, S.; HERZOG, B.; HENNECK, H. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein. **FEBS Lett.**, v. 225, p. 167-171, 1989.

GILLES-GONZALES, M. A.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D. R. A haemo-protein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. **Nature**, v. 350, p. 170-172, 1991.

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.**, v. 180, p. 6661-6667, 1998.

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

HO, Y. S.; BURDEN, L. M.; HURLEY, J. H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J.**, v.19, p.5288-5299, 2000.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chem. Rev.**, v.96, p.2965-2982, 1996.

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

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v.33, p.389-397, 1994.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M. J. Conservation of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v.134, p.1779-1784, 1988.

KOCHER, T.D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In: BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LEE, H. S.; BERGER, D. K.; KUSTU, S. Activity of purified NIFA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90(6), p. 2266-2270, 1993.

LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense*. Their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Mol. Gen. Genet.**, v.240, p.188-196, 1993.

LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Mol. Microbiol.**, v.5, p.2735-2744, 1991.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct interaction of the 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.15472-81, 2002.

LITTLE, R.; DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.2871-2878, 2003.

LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; VAN HEESWIJK, W.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. **EMBO J.**, v.19, p.6041-6059, 2000.

MERRICK, M. J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. **EMBO J.**, v. 2, p. 39-44, 1983.

MERRICK, M. J. Nitrogen control of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. In: KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; GALLON, J. R.; NEWTON, W. E. **Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria**. Amsterdam, p. 97-233, 2004.

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

MERRICK, M.; CHAMBERS, S. The Helix-Turn-Helix Motif of σ^{54} Is Involved In Recognition of the -13 promoter region. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 7221-7226, 1992.

MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, M.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 185, p. 75-81, 1982.

MORETT, E. BUCK, M. NifA dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 9401-9405, 1988.

PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência Hoje**, v.6, p.12-13, 1987.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.55, p.95-101, 1984.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, p.375-85, 1982.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **J. Bacteriol.**, v.183, p.3076-3082, 2001.

ROBERTS, G. P.; MACNEIL, T.; MACNEIL, D.; BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v.136, p.267-279, 1978.

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

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

SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHELESSMAN, J.; HOWARS, J. B.; REES, D. C. Structure of ADP-AIF₄⁻-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature**, v.387, p.370-376, 1997.

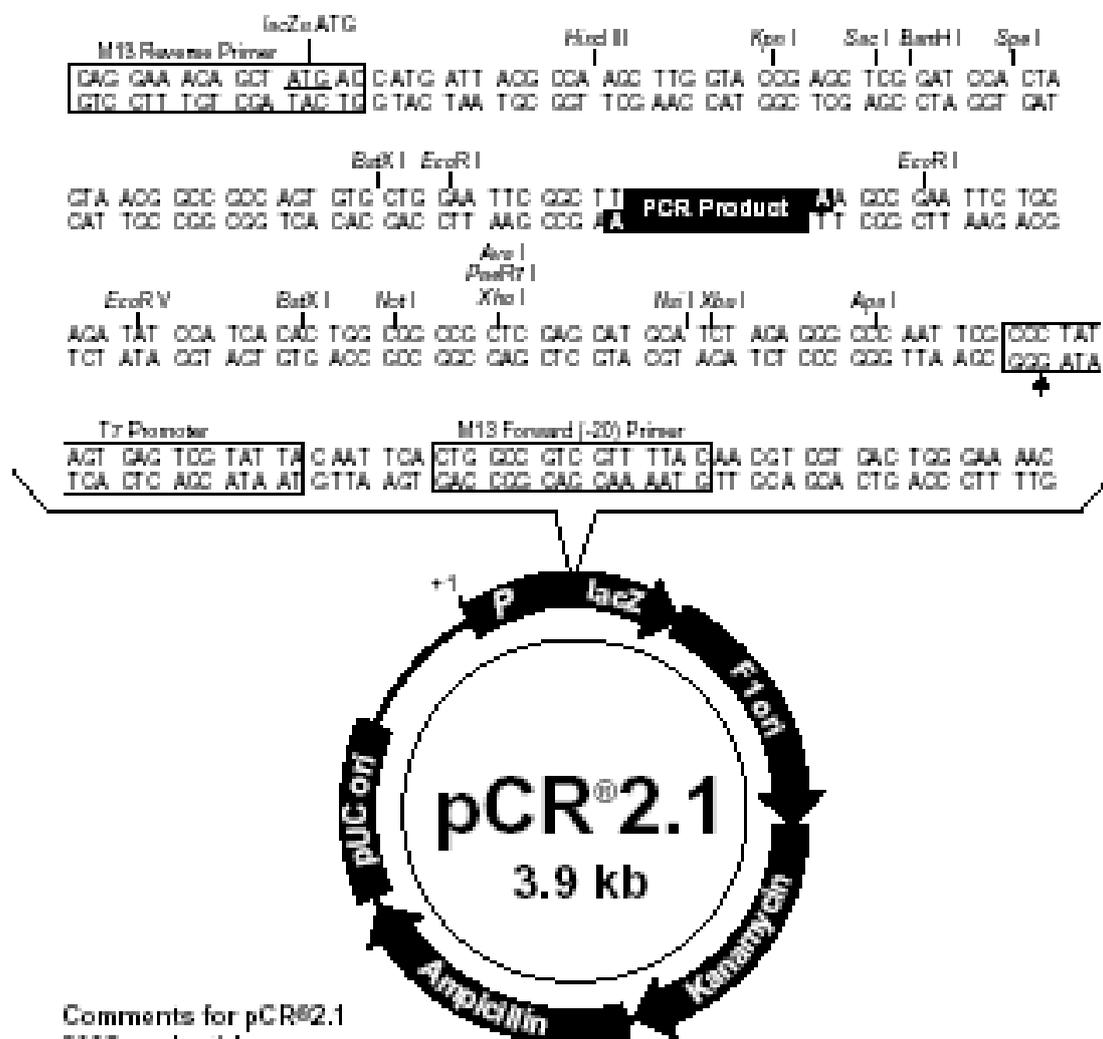
SINGH, M.; TRIPATHI, A. K.; ROBERTS, G. P. Identification of a regulatory *nifA* type gene and physical mapping cloned new *nif* regions of *a. brasilense*. **Mol. Gen. Genet.**, v.219, p. 235-240, 1989.

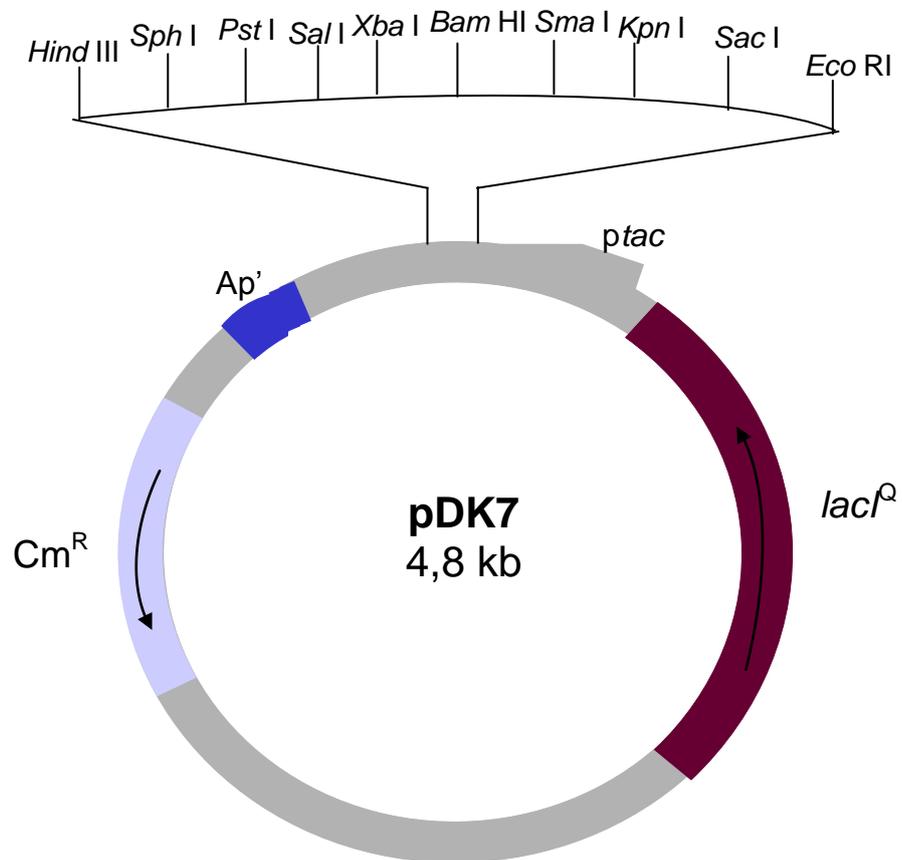
SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA Activity by Ammonium Ions and Oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

WHITEHALL, S.; AUSTIN, S.; DIXON, R. DNA supercoiling response of the σ^{54} – dependent *Klebsiella pneumoniae nifL* promoter *in vitro*. **J. Mol. Biol.**, 1992.

YATES, M. G. Biochemistry of nitrogen fixation. In: MIFTIN, B. (ed.) **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, v.5, p.1-64, 1980.

APÊNDICE 1 – Vetor de clonagem pCR2.1 (Invitrogen)



APÊNDICE 2 – Vetor de expressão pDK7 (KLEINER *et al.*, 1988)

APÊNDICE 3 – Vetor de expressão pET28a (Novagen)

