

ANGELITA DO ROCIO SCARPIM

**SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL
DA REGIÃO A MONTANTE DO GENE *modE* DE *Herbaspirillum
seropedicae***

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Liu Un Rigo

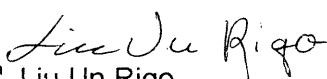
CURITIBA

2002

ANGELITA DO ROCIO SCARPIM

**Seqüenciamento e análise estrutural e funcional da região a montante do gene *modE*
de *Herbaspirillum seropedicae***

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:

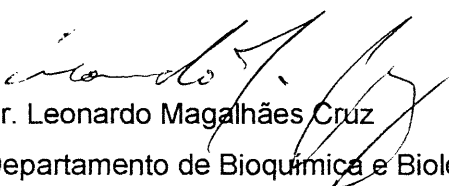

Dr^a. Liu Un Rigo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

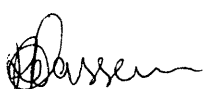


Dr. David Alexander Mitchell

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR


Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR


Dr^a. Roseli Wassem

Departamento de Genética – UFPR

Curitiba, 29 de agosto de 2002

Orientadores: Profa. Dra. Liu Un Rigo

Profa. Dra. Maria Berenice R. Steffens

AGRADECIMENTOS

A Deus por eu ter chegado até aqui, pela força, fé, coragem e esperança.

Aos meus pais João Antônio e Angélica, por tudo o que me ensinaram, por eu ser quem eu sou e pelo apoio nos momentos em que parecia que eu estava só. Aos meus irmãos e irmã pelas “confusões” que eu sentia falta quando morei em outra casa. Ao Márcio pelo seu bom dicionário e pelas “consultorias lingüísticas”, ao Fer pelos empréstimos.

Agradeço às minhas orientadoras professora Liu Un Rigo e professora Maria Berenice R. Steffens pela orientação deste trabalho. Em especial, à professora Liu, por ter acreditado em mim, quando muitos duvidaram. À Bere pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos professores Fábio, Elaine, Emanuel, Leda, Giseli pelas contribuições preciosas.

Aos funcionários Roseli Prado, Dona Jú e Valter pela atenção dispensada e auxílios prestados, em especial à Roseli pela atenção e conselhos.

Aos colegas da “senzala” Lys, Helisson, Patilene, Stefan, Roseli, Rose Adele, Juliana, Daniel e Karen, pelas risadas e por todos os momentos de descontração que tornaram o trabalho e as dificuldades mais leves. Em especial à Lys e à Patilene por todos os favores e à Roseli por todas as “perguntas” respondidas.

Aos meus colegas da turma de Mestrado: Adriano, Marcelo, Sérgio, Ana Paula Mariana, Carol, Stefan, Ângela, Alan, Rodrigo, Lílian, Luciano e Caroline pelos momentos de descontração. Em especial à Carol, Ângela, Lílian, Luciano e Stefan pelas dicas e conhecimentos repartidos.

Às minhas colegas de turma Rosiane e Paulinha que se tornaram amigas e sempre me deram a força, a amizade, o carinho e o incentivo que eu precisava, nos momentos de desânimo e desilusões e também por poder dividir com elas minhas histórias.

Aos meus colegas de laboratório Ana Cláudia, Luiza, Mariana, Rafael, Juliana Schimdt, André, Adriana Invitti, Fabiane, Adriana Twerdochlib, Humberto, Leonardo, Lauren, Juliana Inaba, Andrea pelo companheirismo e auxílios prestados. Em especial a Fabiane pela ajuda nas hibridizações e a Adriana T. pela ajuda nas clonagens.

Às amigas Cláudia, Bernadete, Lorena e Dadi pela amizade e incentivo.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica e a todos os professores do Departamento de Bioquímica que contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e PRONEX pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fixação biológica de nitrogênio.....	1
1.2. Genética da fixação biológica de nitrogênio.....	3
1.3. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	4
1.4. Genes <i>mod</i>	6
1.4.1. Genes <i>mod</i> em <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	9
1.5. Genes <i>lux</i>	11
1.6. Objetivos.....	16
1.6.1. Objetivo geral.....	16
1.6.2. Objetivos específicos.....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1. Microrganismos, plasmídeos e fago.....	17
2.2. Condições de cultivo.....	19
2.3. Manipulação do DNA.....	22
2.3.1. Purificação de plasmídeos pela técnica de lise alcalina.....	22
2.3.2. Purificação de plasmídeos de células de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	23
2.3.3. Purificação de plasmídeos por “fast-prep”.....	23
2.3.4. Purificação de plasmídeos para sequenciamento.....	24
2.3.5. Purificação de plasmídeos em larga escala (maxiprep).....	24
2.3.6. Purificação de DNA cromossômico.....	25
2.4. Eletroforese em gel de agar ou agarose.....	26
2.5. Transformação bacteriana por choque térmico.....	26
2.5.1. Preparo de células competentes por tratamento com TSS e transformação por choque térmico.....	26
2.5.2. Preparo de células competentes por tratamento com cloreto de cálcio e transformação por choque térmico.....	27
2.6. Transformação bacteriana por eletroporação.....	28
2.6.1. Preparo de células eletrocompetentes.....	28
2.6.2. Eletroporação.....	28

2.7. Clivagem do DNA por enzimas de restrição.....	29
2.8. Ligação do DNA.....	30
2.9. Obtenção das fusões transcricionais com o gene <i>lacZ</i>	30
2.10. Amplificação do DNA.....	32
2.11. Seqüenciamento do DNA.....	32
2.12. Preparo e titulação de estoque de fago λ ::Tn5-B20.....	33
2.13. Mutagênese de plasmídeos por inserção de transposon.....	34
2.14. Obtenção de mutantes cromossômicos.....	35
2.15. Hibridização de DNA.....	35
2.15.1. Transferência do DNA para membrana de nylon.....	36
2.15.2. Marcação da sonda.....	36
2.15.3. Pré-hibridização e hibridização.....	37
2.16. Determinação da atividade de β - galactosidase.....	37
2.17. Determinação da atividade de nitrogenase.....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1. Mutagênese do gene <i>modE</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	39
3.1.1. Obtenção de mutante cromossômico.....	46
3.1.2. Atividade de nitrogenase dos mutantes simples-recombinantes.....	46
3.2. Análise estrutural da região a montante do gene <i>modE</i>	48
3.2.1. Seqüenciamento e análise da região proximal da <i>orf4</i> de <i>H. seropedicae</i>	48
3.2.2. Análise da <i>orf4</i> e da região a montante ao gene <i>nifA</i>	50
3.2.3. Gene <i>luxA</i>	55
3.3. Análise de uma possível região promotora para os genes <i>luxA</i> e/ou <i>modE</i> de <i>H. seropedicae</i>	61
3.3.1. Subclonagem do fragmento <i>EcoRI/PstI</i> de pELV22B.....	61
3.3.2. Subclonagem do fragmento <i>EcoRV/PstI</i> de pELV2B.....	64
3.3.3. Ensaios da atividade de β - galactosidase.....	67
4. CONCLUSÕES.....	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
Anexo I.....	85
Anexo II.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação da organização estrutural dos genes <i>mod</i> e/ou <i>mop</i> de <i>H. seropedicae</i> com outras espécies.....	10
Figura 2. Mapa de restrição do plasmídeo pELV2B e de plasmídeos derivados.....	31
Figura 3. Perfil eletroforético dos transformantes <i>E. coli</i> S17.1 (pELV2B : :Tn5-B20).....	41
Figura 4. Perfil eletroforético do transformante nº8 (<i>E. coli</i> S17.1(pELV2B : :Tn5-B20).....	42
Figura 5. Seqüenciamento do fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I mutagenizado do plasmídeo pARS8.....	43
Figura 6. Esquema da inserção do transposon Tn5-B20 no gene <i>modE</i>	44
Figura 7. Perfil eletroforético do plasmídeo pARS8.....	45
Figura 8. Hibridização dos mutantes cromossômicos.....	47
Figura 9. Seqüenciamento da região proximal da <i>orf4</i> contida no plasmídeo pELV22B	49
Figura 10. Sequência da região a montante ao gene <i>modE</i> (gene <i>luxA</i>).....	51
Figura 11. Identificação da provável região codificadora de proteína do gene <i>luxA</i>	52
Figura 12. Seqüência de nucleotídeos do gene <i>luxA</i> e seqüência de aminoácidos deduzida proteína LuxA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	54
Figura 13. Organização estrutural dos genes <i>modE</i> , <i>luxA</i> e <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i>	57
Figura 14. Organização dos genes <i>lux</i> no genoma de diferentes microrganismos.....	58
Figura 15. Alinhamento da seqüência de aminoácidos das proteínas LuxA de <i>H. seropedicae</i> (Herbas), <i>V.harveyi</i> (Vibrio), <i>B. japonicum</i> (Brady), <i>X. fastidiosa</i> (Xylell), <i>Rhizobium</i> sp. (Rhizob) e <i>Nostoc</i> sp. (Nostoc).....	60

Figura 16. Esquema das subclonagens dos fragmentos derivados do plasmídeo pELV2B...	62
Figura 17. Perfil eletroforético dos plasmídeos pANG2 e pANG3.....	63
Figura 18. Perfil eletroforético do plasmídeo pSCA2.....	65
Figura 19. Perfil eletroforético dos plasmídeos pANGPK9 e pANGPK10.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes utilizadas.....	17
Tabela 2. Plasmídeos e fago utilizados.....	18
Tabela 3. Atividade de β -galactosidase.....	68

ABREVIATURAS

ATP	-	adenosina trifosfato
Amp	-	ampicilina
Da	-	Dalton
DDT	-	ditiotreitol
DNA	-	ácido desorribonucléico
D.O.	-	densidade óptica
DNTP	-	desoxirribonucleosídeos trifosfato
EDTA	-	ácido etilenodiamino-tetracético
Km	-	canamicina
ONPG	-	α -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ORF	-	seqüência com potencial para codificar para uma proteína, do inglês <i>open reading frame</i>
PEG	-	polietilenoglicol
q.s.p	-	quantidade suficiente para
RNA	-	ácido ribonucléico
RNAse	-	ribonuclease
rpm	-	rotações por minuto
SDS	-	dodecil sulfato de sódio
Sm	-	estreptomicina
Tc	-	tetraciclina
Tris	-	tris (hidroximetil)-aminometano
TSS	-	do inglês <i>transformation and storage solution</i>

RESUMO

O gene *modE* codifica para um potencial repressor de transcrição dos genes *modABC*, envolvidos com o transporte de molibdênio. Em *Herbaspirillum seropedicae* o gene *modE* foi identificado a cerca de 1,8kb a montante do gene *nifA* por Voigt (2000). Este gene foi seqüenciado e caracterizado estruturalmente. Neste trabalho o gene *modE*, contido no plasmídeo pELV2B, foi mutagenizado por inserção do transposon *Tn5B20* originando o plasmídeo pARS8. Este plasmídeo foi transferido para *H. seropedicae* e mutantes cromossômicos foram obtidos por simples recombinação. Estes mutantes apresentaram atividade de nitrogenase semelhante à da estirpe controle *H. seropedicae* SmRI, indicando que não houve comprometimento no processo de fixação de nitrogênio. O plasmídeo pELV2B continha também, a montante do gene *modE*, parte de uma ORF denominada *orf4* e que foi subclonada no plasmídeo pELV22B (VOIGT,2000). Neste trabalho foi concluído o sequenciamento do DNA-inserto do plasmídeo pELV22B e a seqüência inicial da *orf4* que era de 449 nucleotídeos aumentou para 687 nucleotídeos. Esta seqüência parcial somada a uma seqüência contendo 498 nucleotídeos, situada em outro fragmento a montante, produziu uma seqüência completa que foi identificada como o gene *luxA*, através de comparações com seqüências de aminoácidos do banco de dados. O gene *luxA* codifica para a subunidade α da luciferase, enzima que catalisa reações de emissão de luz em bactérias luminescentes. O gene *luxA* de *H. seropedicae* possui 1032 nucleotídeos e foi localizado a montante do gene *modE* e a aproximadamente 1,2 kb a montante do gene *nifA*. Ele é transcrito na mesma direção do gene *modE* e em direção oposta ao gene *nifA*. O seu provável códon de término de tradução está sobreposto ao códon de início de tradução do gene *modE*. A seqüência de aminoácidos deduzida da proteína LuxA apresenta um possível domínio bac_luciferase. Para analisar a presença de uma possível região promotora para os genes *modE* e/ou *luxA* foram realizadas fusões no vetor de fusão-*lacZ* sem promotor pMP220. Foram clonados os fragmentos correspondentes a uma região de 585 nucleotídeos (*Pst*II/*Eco*RI) e a uma região de 1266 nucleotídeos (*Pst*II/*Eco*RV) ambas a montante ao gene *modE*. Esta última contendo 978 dos 1032 nucleotídeos do gene *luxA* mais 258 nucleotídeos a montante a este gene. Os fragmentos foram clonados e ensaiados para a atividade de β -galactosidase. Os resultados foram negativos indicando, provavelmente, a ausência de promotor nestas regiões.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fixação biológica de nitrogênio

Todos os organismos vivos necessitam de nitrogênio para a biossíntese de aminoácidos e bases púricas e pirimídicas, constituintes das proteínas e dos ácidos nucleicos. O gás nitrogênio (N_2) corresponde a 80% dos gases totais da atmosfera, mas não é assimilável diretamente pela maioria dos seres vivos (POSTGATE, 1989). Na maioria dos solos, a disponibilidade deste nutriente é pequena, quando comparada com as necessidades da cobertura vegetal (EPSTEIN, 1975).

A sustentabilidade da agricultura depende de um manejo efetivo do nitrogênio no ambiente (GRAHAM & VANCE, 2000), o que envolve o uso de fertilizantes ou a otimização do processo de fixação biológica de nitrogênio (POSTGATE, 1982). O N_2 fixado biologicamente é usado diretamente pela planta e é menos suscetível a volatilização, denitrificação e lixiviação. Aproximadamente 80% deste nitrogênio fixado biologicamente vem da simbiose envolvendo plantas leguminosas e espécies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*. No entanto cada vez mais outros organismos tem sido estudados e considerados como grandes contribuidores para a fixação de nitrogênio como simbióticos ou associativos (GRAHAM & VANCE, 2000).

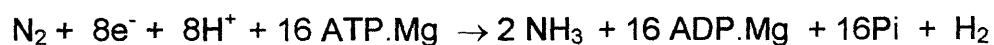
Com o alto requerimento de nitrogênio pelas plantas produtoras de grãos não teria sido possível a grande produção alcançada nas últimas décadas se não fosse o uso de fertilizantes nitrogenados, uma vez que é comum a deficiência de nitrogênio no solo dos trópicos e subtrópicos (GRAHAM & VANCE, 2000). Estes fertilizantes, além de apresentarem um alto custo, podem causar danos ecológicos quando utilizados indiscriminadamente. Isto inclui produção de óxido nitroso, liberado pela redução parcial do nitrato, que juntamente com o dióxido de carbono diminuem a perda de calor pela terra contribuindo para o chamado efeito estufa; ocorrência das chuvas ácidas; produção de nitrato, derivado dos fertilizantes nitrogenados que pode causar contaminação dos reservatórios de água (POSTGATE, 1982; GRAHAM & VANCE, 2000). A utilização de microrganismos fixadores de nitrogênio como biofertilizantes é mais econômica e inofensiva ao meio quando comparada com o

uso destes fertilizantes químicos nitrogenados (POSTGATE, 1982). Sendo assim, é de extrema importância o estudo dos mecanismos envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio e na sua regulação em vários organismos, principalmente naqueles associados a plantas de interesse econômico.

Fixação biológica de nitrogênio é a capacidade de diferentes grupos de procariotos de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3), em reação catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (EADY, 1986; POSTGATE, 1989; YOUNG, 1992). Microrganismos denominados diazotrofos são os que apresentam esta propriedade (POSTGATE, 1989; YOUNG, 1992), e contribuem com aproximadamente 60% do nitrogênio fixado no planeta, sendo, portanto essenciais para a manutenção do ciclo do nitrogênio.

O complexo enzimático da nitrogenase também é capaz de reduzir outros substratos contendo ligações triplas terminais do tipo: $-C\equiv C-$, $-C\equiv N$, $N\equiv N$, $N\equiv O$ (EADY e POSTGATE, 1974; POSTGATE, 1982) presentes por exemplo no acetileno, cianeto, óxido nitroso e outros compostos similares (DILWORTH, 1966; SCHÖLLORN & BURRIS, 1967; RIVERA-ORTIZ *et al.*, 1975; RUBINSON *et al.*, 1983).

A estequiometria da reação catalisada pela nitrogenase segundo Simpson & Burris (1984) é :



O complexo enzimático da nitrogenase é composto por duas proteínas: a dinitrogenase-redutase ou proteína ferro (proteína-Fe) e a dinitrogenase ou proteína ferro-molibdênio (proteína-FeMo) (DEAN *et al.*, 1993; HOWARD & REES, 1996). A proteína Fe é um homodímero constituído de 2 subunidades γ com massa molecular de aproximadamente 57.000 a 72.000 Da, de acordo com o microrganismo da qual foi isolada (EADY *et al.*, 1988). Ela possui um núcleo FeS ($4Fe4S$) ancorado entre as duas subunidades e é responsável pela transferência de elétrons para a proteína FeMo, sendo esta etapa acoplada à hidrólise de ATP (KIM *et al.*, 1993; HOWARD & REES, 1996).

A proteína-FeMo é um tetrâmero formado por duas subunidades α e duas subunidades β ($\alpha_2\beta_2$) de massa molecular total de cerca de 220 kDa (EADY *et al.*, 1972; HOWARD & REES, 1994). As massas moleculares das subunidades α e β são de cerca de 55 e 60 kDa, respectivamente (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 dois tipos de núcleos metálicos: o núcleo P (FeS) e o cofator ferro-molibdênio (Fe-Moco). Cada dímero $\alpha\beta$ contém um núcleo P e um cofator FeMoco (KIM & REES, 1994).

Para que a fixação biológica de nitrogênio ocorra são requeridas condições ambientais favoráveis para os diazotrofos, tais como: disponibilidade de metais, principalmente molibdênio e ferro, para a expressão da nitrogenase (CLARKE & CARBON, 1976; PRESTON & LUDDEN, 1983); tensão ideal de oxigênio, uma vez que a nitrogenase sofre oxidação (POSTGATE, 1982); disponibilidade de energia e ATP; temperatura ideal já que baixas temperaturas favorecem a evolução do H_2 sobre a redução do N_2 (THORNELEY & EADY, 1977) e ausência de NH_3 pois os diazotrofos não sintetizam nitrogenase se a amônia estiver disponível no meio (POSTGATE, 1982).

1.2. Genética da fixação biológica de nitrogênio

Os genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio foram identificados primeiramente em *Klebsiella pneumoniae*. Nesta espécie bacteriana 20 genes estão envolvidos neste processo (genes *nif*), organizados em 8 operons (MERRICK, 1992). *Klebsiella pneumoniae* é utilizada como modelo para estudo em outros microrganismos. Os genes *nif*, nas diferentes espécies, estão organizados em diferentes padrões de acordo com o nível de adaptação ou fisiologia do organismo (PEDROSA *et al.*, 2001).

Estudos comparativos dos genes *nif* de diversos microrganismos, tais como: *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Enterobacter agglomerans* e *K. pneumoniae* sugerem que existam pelo menos 14 genes em comum entre estes organismos, que são *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*,

nifU, *nifS*, *nifV*, *nifZ*, *nifW*, *nifM*, *nifB*, *nifQ*; cujos produtos devem ser essenciais para a biossíntese da nitrogenase (MERRICK, 1992; 1995).

Em *K. pneumoniae* a transcrição dos genes *nif* é dependente da proteína ativadora NifA, cujo gene é co-transcrito com o gene *nifL*. O produto deste gene, a proteína NifL, modula a atividade de NifA em resposta ao oxigênio e ao nitrogênio fixado (GOVANTES *et al.*, 1996).

1.3. *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria gram-negativa pertencente à divisão Proteobacteria, subdivisão Beta (YOUNG, 1992). Apresenta geralmente forma vibrióide, às vezes helicoidal, com um a três flagelos em um ou em ambos os polos. O diâmetro das células varia de 0,6 a 0,7 μm e o comprimento, entre 1,5 e 5,0 μm . É uma bactéria fixadora de nitrogênio isolada em 1986 por BALDANI *et al.* e tem sido considerado um endófito obrigatório. Foi inicialmente sugerido como uma nova espécie de *Azospirillum*, contudo, diferindo deste em relação as dimensões das células, número de flagelos e coloração das colônias (BALDANI *et al.* 1986). Falk *et al.* (1986), com base em experimentos de hibridização RNA/RNA, mostraram a pequena relação entre *H. seropedicae*, *Azospirillum* e *Aquaspirillum itersoni*; Baldani *et al.* (1986) demonstraram que a homologia DNA/DNA entre *H. seropedicae* e *Azospirillum spp* era menor que 24%, sendo proposta a criação do gênero *Herbaspirillum*. Diferenças entre *Herbaspirillum* e *Azospirillum* também foram confirmadas por seus padrões protéicos em SDS-PAGE (DIANESE *et al.*, 1989). *H. seropedicae* fixa nitrogênio atmosférico em condições microaeróbias e assimila nitrato a nitrito sob limitação de oxigênio. Cresce entre 30 e 40°C e em pH variando de 5,3 a 8,0. O conteúdo de G + C do DNA é de $67 \pm 0,5$ mol%. Pode ser encontrada em raízes, caules, folhas e sementes de muitas gramíneas, tais como: milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar e plantas forrageiras (BALDANI *et al.*, 1997), em Ananaceae (abacaxizeiro) e Musaceae (bananeira) (WEBER *et al.*, 1999), plantas de interesse econômico, daí a importância atribuída a este microrganismo.

O estudo dos genes *nif*, *fix*, *gln* e *ntr* relacionados com a fixação, o metabolismo de nitrogênio e a sua regulação (MERRICK & EDWARDS, 1995) pode

auxiliar no esclarecimento destes processos em *Herbaspirillum seropedicae* e na obtenção de estirpes geneticamente modificadas que possam funcionar como fertilizantes biológicos. Já foram identificados e realizados estudos dos genes *nifA* (SOUZA *et al.*, 1991a), *nifB* (SOUZA *et al.*, 1991b; REGO *et al.*, 1997), *glnAntrBC* (TEIXEIRA, 1991; STEFFENS *et al.*, 1997; PERSHUN *et al.*, 2000), *recA* (STEFFENS *et al.*, 1993), *nifHDK* (MACHADO *et al.*, 1996), *glnB* (BENELLI *et al.*, 1997), *recX* (GALVÃO, 2001), *nifENXorf1orf2* (KLASSEN *et al.*, 1999), *nifQmodABC* e *fixXC* (KLASSEN, 2000), *orf4modEorf5orf6* (VOIGT, 2000) e *amtBglnK* (NOINDORF, 2002).

O gene *nifA* consiste de uma unidade transcricional independente que codifica para a proteína NifA, um ativador de transcrição dos genes de fixação de nitrogênio (genes *nif*) (SOUZA *et al.*, 1991a).

O gene *nifB* está seqüenciado e localizado a jusante do gene *nifA* e é transcrito na mesma direção (SOUZA *et al.*, 1991b). Codifica para a proteína NifB, possivelmente envolvida no processamento do cofator ferro-molibdênio da nitrogenase.

O operon *glnAntrBC* codifica para glutamina sintetase (GS) e as proteínas NtrB e NtrC, respectivamente (RIGO *et al.*, 1996). A enzima glutamina sintetase catalisa a síntese de glutamina a partir de amônio e glutamato. As proteínas NtrB e NtrC constituem um sistema regulatório de dois componentes envolvido com a fixação e o metabolismo de nitrogênio. NtrB atua como uma histidina quinase de membrana, fosforilando NtrC em baixas concentrações de amônio, enquanto NtrC fosforilada atua como um ativador de transcrição dos genes de fixação e metabolismo de nitrogênio (PERSUHN *et al.*, 2000).

O operon *recAX* codifica para a proteína RecA, que atua na recombinação homóloga e no reparo do DNA (STEFFENS *et al.*, 1993), e para a proteína RecX, que também deve atuar nestes processos (GALVÃO, 2001).

O operon *nifHDKENXorf1orf2* contém os genes estruturais da nitrogenase, *nifHDK*, os quais codificam para a subunidade γ da proteína Fe e as subunidades α e β da proteína FeMo desta enzima, respectivamente (MACHADO *et al.*, 1996). Os genes *nifENX* também estão relacionados com a fixação de nitrogênio e suas respectivas proteínas devem atuar na biossíntese do cofator ferro-molibdênio (FeMoco) da nitrogenase. Os genes *orf1orf2* têm funções desconhecidas. A *orf1*

codifica para uma proteína semelhante à ferredoxina encontrada em *Rhodobacter capsulatus* e *Rhizobium sp.* O produto da *orf2* não apresenta similaridade com nenhuma proteína conhecida (KLASSEN *et al.*, 1999; KLASSEN, 2000).

O gene *glnB* é uma unidade transcricional independente que codifica para a proteína PII, relacionada com a regulação do metabolismo de nitrogênio conforme a disponibilidade de amônio no ambiente (BENELLI *et al.*, 1997).

O operon *nifQmodABC* está localizado a jusante do operon *nifHDKENXorf1orf2* e está orientado na mesma direção. A proteína NifQ deve estar relacionada com a incorporação de molibdênio no cofator ferro-molibdênio (FeMoco) da nitrogenase. As proteínas ModA, ModB e ModC formam um sistema de transporte de molibdênio de alta afinidade, pertencente à família de transportadores ABC (KLASSEN, 2000; GRUNDEN & SHANMUGAM, 1997).

O operon *fixXC* está parcialmente seqüenciado e disposto a jusante do operon *nifQmodABC* e é transcrito na direção oposta. Codifica para as proteínas FixX e FixC, as quais provavelmente atuam na transferência de elétrons para a nitrogenase (KLASSEN, 2000).

A potencial função da *orf4* ainda não é conhecida. A proteína ModE codificada pelo gene *modE*, provavelmente, é uma proteína ligante de molibdênio repressora de transcrição dos genes *modABC*. A proteína ORF5 codificada pela *orf5* apresentou identidade com a transposase Trs5 e a seqüência de aminoácidos deduzida da região distal da *orf6* mostrou similaridade com a região C-terminal de diversas proteínas da família de citotoxinas RTX (VOIGT, 2000).

Os genes *amtB* e *glnK* foram seqüenciados e são contíguos sendo co-transcritos. O gene *amtB* codifica para a proteína AmtB, um provável transportador de íons amônio e o gene *glnK* codifica para a proteína GlnK que faz parte da família de proteínas P_{II}, um tipo de proteína transdutora de sinal (NOINDORF, 2002).

1.4. Genes *mod*

O molibdênio, embora seja requerido apenas em quantidades mínimas, exerce uma função crítica em várias vias metabólicas em todos os organismos. Estas vias contribuem, por exemplo, para a produção de energia, no caso da

respiração anaeróbica em bactérias, usando “aceptores de elétrons alternativos” tais como nitrato, dimetilsulfóxido (GRUNDEN & SHANMUGAM, 1997). Este elemento é um componente essencial de um grande número de enzimas, onde ele está presente na forma de dois tipos de cofatores: o cofator ferro- molibdênio, na nitrogenase, e os cofatores molibdopterinas em todas as outras molibdoenzimas conhecidas (IMPERIAL *et al.*, 1998). A redução de nitrato a nitrito e de dinitrogênio a amônia requer as molibdoenzimas nitrato redutase e dinitrogenase, respectivamente (GRUNDEN & SHANMUGAM, 1997) e a redução de dimetilsulfóxido requer outra molibdoenzima, a dimetilsulfóxido redutase (WOOTTON *et al.*, 1991). O molibdênio é um elemento relativamente abundante na crosta terrestre, em duas principais formas químicas, MoS_2 e MoO_4^{2-} . Apenas o molibdênio na forma de molibdato está prontamente solúvel e estável em soluções aquosas, e esta é, então, a única fonte disponível de molibdênio para os sistemas biológicos (IMPERIAL *et al.*, 1998).

Os genes *mod* estão envolvidos com o transporte de molibdênio sob a forma de íons molibdato (LUQUE *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1993; MOUNCEY *et al.*, 1995; MAUPIN-FURLOW *et al.*, 1995). Em *A. vinelandii* (LUQUE *et al.*, 1993; MOUNCEY *et al.*, 1995), *E. coli* (MAUPIN-FURLOW *et al.*, 1995) e *R. capsulatus* (WANG *et al.*, 1993), os genes *modABC* codificam para proteínas que integram um sistema de transporte de íons molibdato de alta afinidade, as quais fazem parte da família de transportadores ABC. Nestes organismos, ModA é uma proteína periplasmática ligante de molibdato, ModB é uma proteína transmembrana formadora de canal e ModC é uma proteína ligante de ATP. Estes genes do sistema de transporte de molibdato foram isolados e sequenciados a partir de *E. coli* (MAUPIN-FURLOW *et al.*, 1995), de *R. capsulatus* (WANG, 1993) e de *A. vinelandii* (LUQUE *et al.*, 1993; MOUNCEY *et al.*, 1995). Para *E. coli* e *R. capsulatus* foi identificado também o gene *modD* que codifica para a proteína ModD que não apresenta similaridade de sequência com o banco de dados e cuja função no transporte não é clara. Projetos de sequenciamento de genomas com bactérias relacionadas têm revelado uma grande ocorrência do sistema *mod* (IMPERIAL *et al.*, 1998).

Estudos com mutantes *mod* revelaram sua incapacidade para produzir determinadas molibdoenzimas, nitrato redutase por exemplo, sem suplementação de molibdato. Isto sugere que quando estes mutantes são crescidos em meio suplementado com molibdato, ele entra nas células através do sistema de transporte

de sulfato ou por outros transportadores aniônicos não específicos (ROSENTEL *et al.*, 1995; GRUNDEN *et al.*, 1996).

Em *A. vinelandii* (LUQUE *et al.*, 1993; MOUNCEY *et al.*, 1995; MOUNCEY *et al.*, 1996) e *E. coli* (GRUNDEN *et al.*, 1996), o gene *modE* codifica para um repressor de transcrição dos genes *modABC*. Em *E. coli*, a proteína ModE se liga ao íon molibdato quando este se encontra, intracelularmente, em altas concentrações, formando o complexo ModE-molibdato. Este complexo forma um dímero e se liga a um operador localizado a montante do gene *modA*, impedindo a transcrição dos genes *modABC* (McNICHOLAS *et al.*, 1998; GRUNDEN *et al.*, 1999). Ensaios de atividade de β -galactosidase com fusões *modE-lacZ* em *E. coli* indicaram que o gene *modE* é transcrito constitutivamente em nível basal (GRUNDEN *et al.*, 1996), e outros ensaios para testar a regulação da expressão da proteína ModE indicaram também que ela é sintetizada constitutivamente (McNICHOLAS *et al.*, 1996). Os genes *mopA* e *mopB* de *R. capsulatus* que codificam para proteínas ligantes de molibdopterinas (WANG *et al.*, 1993), são similares ao gene *modE* de *E. coli* (GRUNDEN *et al.*, 1996) e ao gene *modE* de *A. vinelandii* (LUQUE *et al.*, 1993; MOUNCEY *et al.*, 1995).

Em *E. coli* (RECH *et al.*, 1995) foram identificadas três prováveis seqüências regulatórias do operon *modABCD*: uma região CATAA box (nas posições +2 a +6), uma região CATTA box (nas posições +12 a +17) e uma região de simetria com 16 pb (CTGGGAAAATTCCGAG) localizada nas posições -22 a -37. Foram encontradas seqüências com homologia para estas regiões regulatórias (RECH *et al.*, 1995) em outros genes bacterianos relacionados ao molibdênio (*E. coli*, operon *moa*) e em outros organismos, onde estão relacionadas a captação de molibdênio (*A. vinelandii*, operon *mod*) ou de sulfato (*Salmonella typhimurium*, operon *cysP*). Estudos posteriores em *E. coli* (GRUNDEN *et al.*, 1999) revelaram a presença de três regiões essenciais para a ligação do complexo ModE-molibdato ao operador/promotor do operon *modABCD*: GTTAT-ATT (posições -15 a -8), GCCTACAT (posições -4 a +4) e GTTACAT (posições +8 a +14). Em todas estas regiões uma seqüência de 5 pb, TAYAT (Y=C ou T) pode ser identificada.

A proteína ModE de *E. coli* sofre mudança conformacional, dependente de molibdato, que promove mudança na forma e alterações na sua superfície. Estas

mudanças podem fornecer o sinal para o recrutamento de outras proteínas para construir a maquinaria transcricional (GOURLEY *et al.*, 2001).

A expressão do operon *moa* em *E. coli*, que codifica para enzimas requeridas para a biossíntese de molibdopterinas, requer molibdato e para isso depende completamente de proteína ligante de molibdato, a proteína ModE (ANDERSON *et al.*, 2000). O complexo ModE-molibdato também é um ativador transcricional do operon *hyc* (formiato- hidrogenliase) e do operon *narGHJ* (nitrato redutase respiratória) em *E. coli* (HASONA *et al.*, 1998). Para o operon *hyc*, a proteína FhIA, na presença de formiato e molibdato, é o principal ativador transcricional e o complexo ModE-molibdato funciona como um ativador transcricional secundário (SELF *et al.*, 2001).

1.4.1. Genes *mod* em *Herbaspirillum seropedicae*

Os genes *mod* foram descritos inicialmente para *R. capsulatus* (WANG *et al.*, 1993), *A. vinelandii* (LUQUE *et al.*, 1993; MOUNCEY *et al.*, 1995), *H. influenzae* (FLEISCHMANN *et al.*, 1995) e *E. coli* (MAUPIN-FURLOW *et al.*, 1995; GRUNDEN *et al.*, 1996). Nestes organismos, os genes *mod* estão organizados em operons contíguos e orientados em direções opostas, ocupando um único *locus* no genoma (GRUNDEN *et al.*, 1996). Em *H. seropedicae*, os genes *modABC* estão localizados a jusante do operon *nifHDKENXorf1orf2*, compondo o operon *nifQmodABC* (KLASSEN, 2000) e o gene *modE* a jusante da *orf4* e a montante do gene *nifA* (cerca de 1,8 kb) sendo transcrito na direção oposta deste gene (VOIGT, 2000). Os genes *orf4* e *modE* são transcritos na mesma direção, o códon de término de tradução da *orf4* é sobreposto ao códon de início de tradução do gene *modE* e não foi encontrado promotor típico à frente do gene *modE*, sendo sugerido que estes genes façam parte de um operon (VOIGT, 2000). Assim, os genes *mod* estariam organizados em *H. seropedicae* de uma forma diferente da descrita para outras espécies, ocupando, pelo menos, dois *loci* distintos no genoma (Fig.1).

A seqüência de aminoácidos deduzida do gene *modE* apresentou similaridade com proteínas ligantes de molibdênio (VOIGT, 2000), principalmente

com o repressor de transcrição ModE de *Azotobacter vinelandii* (37% de identidade e 53% de similaridade) (LUQUE *et al.*, 1993; MOUNCEY *et al.*, 1995), de *E. coli* (33% de identidade e 57% de similaridade) (GRUNDEN *et al.*, 1996) e de *Haemophilus influenzae* (26% de identidade e de 63% de similaridade) (FLEISCHMANN *et al.*, 1995) e com as proteínas ligantes de molibdopterinas MopB (33% de identidade e 59% de similaridade) e MopA (31% de identidade e 63% de similaridade) de *Rhodobacter capsulatus* (WANG *et al.*, 1993).

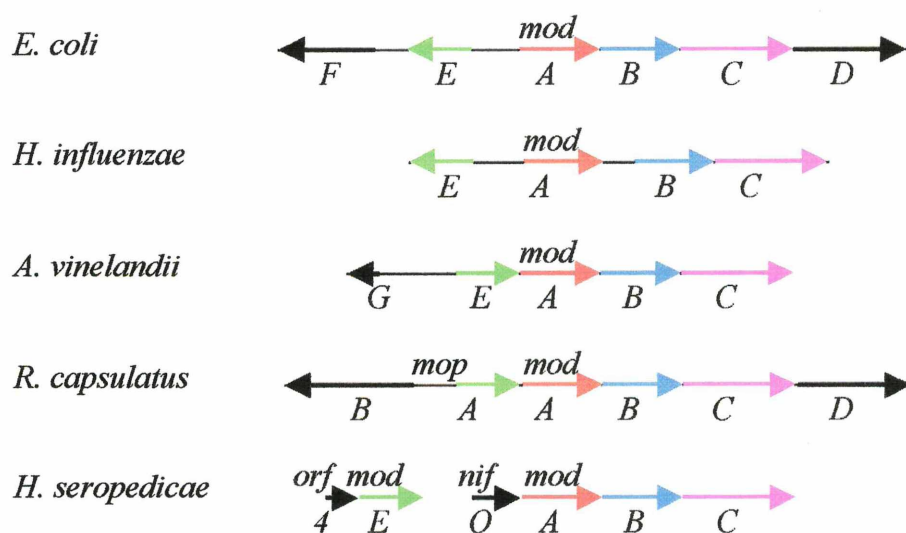


Figura 1. Comparação da organização estrutural dos genes *mod* e/ou *mop* de *H. seropedicae* com outras espécies. As setas indicam a direção de transcrição destes genes. Adaptado de VOIGT (2000).

A proteína ModE de *H. seropedicae* é formada por 269 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular de cerca de 28300 Da (VOIGT, 2000). Ela foi comparada com as proteínas ModE de *A. vinelandii*, de *H. influenzae* e de *E. coli* e com as proteínas MopA e MopB de *R. capsulatus*. A partir desta comparação, foi possível identificar motivos e domínios característicos na proteína ModE de *H. seropedicae* tais como um motivo hélice- volta-hélice que pode estar envolvido com a ligação ao DNA (McNICHOLAS *et al.*, 1998; GRUNDEN *et al.*, 1999) e dois motivos conservados (SARNQ), que podem estar relacionados com a dimerização da proteína ModE (McNICHOLAS *et al.*, 1998).

Tendo em vista a semelhança estrutural entre a proteína ModE de *H. seropedicae* e a de outros organismos foi sugerido por VOIGT (2000) que esta proteína poderia regular a expressão dos genes *modABC*, nesta espécie, em resposta à concentração de íons molibdato. Contudo, estudos mais aprofundados de fisiologia do gene *modE* necessitam ser realizados para confirmar esta hipótese.

Desta forma torna-se importante o estudo fisiológico do gene *modE* de *H. seropedicae*, tendo em vista seu possível papel no metabolismo do molibdênio que como foi descrito, é um elemento essencial na estrutura da nitrogenase e de outras molibdoenzimas. Este estudo também pode contribuir para os conhecimentos sobre a regulação do processo de fixação biológica de nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*.

1.5. Genes *lux*

Análises de uma região seqüenciada do genoma de *Herbaspirillum seropedicae* realizadas neste trabalho revelaram a presença do gene *luxA* que, em outros microrganismos descritos na literatura, codifica para uma das subunidades da enzima luciferase a qual catalisa reações de bioluminescência.

Bioluminescência refere-se ao processo de emissão de luz visível em organismos vivos mediado por catálise enzimática. Este fenômeno tem sido observado em diferentes organismos incluindo bactérias, fungos, peixes, algas e lulas. As enzimas que catalisam a reação de bioluminescência são chamadas luciferases e os substratos são freqüentemente referidos como luciferinas. As

reações de emissão de luz entre os diferentes organismos são bastante distintas, consequentemente a estrutura das luciferases e os seus genes correspondentes não são relacionados (MEIGHEN, 1993).

Bactérias luminescentes são os organismos luminescentes mais abundantes e mais amplamente distribuídos na natureza. Muitas espécies são marinhas de vida livre ou associadas com outros organismos numa relação de simbiose, mas algumas são encontradas em habitats terrestres ou em água doce (MEIGHEN, 1993). A maioria destas espécies marinhas são classificadas nos gêneros *Vibrio* e *Photobacterium*. O gênero *Xenorhabdus* contém espécies que podem infectar organismos terrestres (SZITTNER *et al.*, 1990). As espécies mais amplamente estudadas são *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi* e *Xenorhabdus luminescens*. Outras espécies de bactérias luminescentes são de interesse incluindo linhagens de *Vibrio cholerae*, encontradas em água doce e a espécie aeróbica *Shewanella hanedai* (MEIGHEN, 1993).

A luciferase bacteriana é uma flavina monooxigenase heterodimérica ($\alpha\beta$) responsável por catalisar a reação de emissão de luz em bactérias luminescentes (JOHNSTON *et al.*, 1986). A enzima catalisa a reação luminescente em bactérias luminosas utilizando FMNH₂ (flavina mononucleotídeo reduzida), um aldeído de cadeia longa e O₂, para produzir uma luz verde-azulada em 490nm e os produtos da reação, FMN e o ácido graxo correspondente como mostrado na reação abaixo (LI *et al.*, 1994):



Após a ligação de FMNH₂ e a reação com O₂, a luciferase forma uma hidroxiflavina intermediária, designada como intermediário II, o qual reage com o aldeído para resultar na emissão de luz. Este intermediário é instável e, na ausência de aldeído, se decompõe em FMN, H₂O₂ e luciferase (LI *et al.*, 1994).

A luciferase funciona *in vivo* com a ajuda de várias outras enzimas acessórias que fornecem os substratos FMNH₂ e aldeído através da interação com outros componentes celulares (JOHNSTON *et al.*, 1986). Os aldeídos requeridos

para a reação de emissão de luz podem ser sintetizados *in vivo*, pelas bactérias luminescentes. Esta síntese ocorre a partir de ácidos graxos em reação catalisada por uma enzima ácido graxo redutase dependente de NADPH e ATP. Esta enzima é co-induzida com a luciferase indicando que a função da redutase é a síntese de aldeído de cadeia longa requerida para a reação de luminescência bacteriana (RIENDEAU & MEIGHEN, 1980).

Os genes *lux*, correspondentes às subunidades da luciferase bacteriana (*luxAB*) e aos polipeptídeos da ácido graxo redutase (*luxCDE*) responsável pela biossíntese do substrato aldeído para a reação de luminescência, têm sido clonados e sequenciados a partir de espécies marinhas do gênero *Vibrio* e *Photobacterium* e também a partir de bactérias terrestres do gênero *Xenorhabdus* (SZITTNER *et al.*, 1990; MEIGHEN, 1993).

Os genes *luxA* e *luxB* codificam, respectivamente, para as subunidades α e β da luciferase. Estes polipeptídeos têm, aproximadamente, 30% de identidade na seqüência de aminoácidos e assim parecem ter surgido por duplicação gênica (SZITTNER *et al.*, 1990). Análises de enzimas mutantes e estudos de modificação química indicam que o único centro ativo da luciferase reside primariamente, senão exclusivamente, na subunidade α (COHN *et al.*, 1985). Construções de híbridos para os genes *luxA* e *luxB* de *X. luminescens* e *V. harveyi* revelaram que a subunidade α parece ser a responsável primária por controlar as propriedades estruturais e catalíticas da luciferase (LI *et al.*, 1993).

Os genes *luxCDE* têm sido encontrados nos operons *lux* de todas as bactérias luminescentes com transcrição na ordem *luxCDABE* no gênero *Vibrio* e *luxCDABFE* no gênero *Photobacterium*. O gene *luxF* codifica para uma flavoproteína de função desconhecida que tem homologia com as subunidades da luciferase e parece ser encontrado apenas em espécies do gênero *Photobacterium* (SZITTNER *et al.*, 1990). Os genes *luxCDE* codificam para os polipeptídeos que catalisam a conversão de ácidos graxos em aldeídos de cadeia longa requeridos para a reação de luminescência. O complexo multienzimático da ácido graxo redutase é formado pelas proteínas transferase(t), sintetase(s) e redutase(r) que foram purificadas a partir de *P. phosforeum*. Este complexo canaliza ácidos graxos da via biossintética dos ácidos graxos para a luciferase (MEIGHEN, 1993). Em espécies dos gêneros *Vibrio* e *Photobacterium* foi identificado, a jusante do gene *luxE*, o gene *luxG*. A

proteína LuxG codificada pelo gene *luxG* apresenta uma sequência de aminoácidos relacionada a uma flavina redutase e a outras enzimas transportadoras de elétrons o que sugere que ela está envolvida na produção do substrato para a reação de luminescência (MEIGHEN, 1993; ANDREWS *et al.*, 1992).

Foram identificados ainda outros genes *lux* em algumas espécies de bactérias luminescentes marinhas (MEIGHEN, 1993): os genes *luxH*, *luxL* e *luxY* que parecem estar relacionados a síntese de riboflavina. Também foram clonados e seqüenciados a partir de espécies do gênero *Vibrio* dois genes reguladores, *luxI* e *luxR*. O gene *luxI* é necessário para a síntese de um autoindutor que controla a expressão da luminescência em *V. fischeri* (MEIGHEN, 1993). O produto do gene *luxR* parece funcionar como um receptor para o autoindutor e para ativar a expressão do operon *lux* (MEIGHEN, 1993).

Foi demonstrado através da construção de mutantes (*luxA*, *luxI* e *luxR*), deficientes na atividade da luciferase e das proteínas regulatórias da bioluminescência (VISICK *et al.*, 2000), que os genes *lux* de *V. fischeri* possuem um importante papel na colonização e desenvolvimento do órgão de luz do hospedeiro. A capacidade de bioluminescência é crítica para as interações célula-célula entre uma bactéria e o animal hospedeiro (VISICK *et al.*, 2000).

Estudos com mutantes *luxA*, *luxB* e *luxD* de *V. harveyi* demonstraram que a bioluminescência exerce um importante papel na estimulação do reparo do DNA. A bactéria luminescente tem uma fonte interna de luz, a qual poderia ser usada no reparo do DNA por um processo de fotorreativação. Esta parece ser uma das funções biológicas da luminescência bacteriana (CZYZ *et al.*, 2000).

Os genes *luxA* e *luxB* codificadores da luciferase podem ser utilizados como genes *reporter* na construção de vetores de fusão devido ao fato que a reação de emissão de luz, catalisada pela luciferase, pode ser apropriadamente quantificada. Estes genes *reporter* podem ser utilizados em muitos estudos: Mao *et al.* (2001) relatam a utilização destes genes *reporter* na pesquisa do câncer de fígado, por ser um instrumento de análise sensível e não-invasivo; no desenvolvimento de um método de detecção de *Salmonella* em amostras de alimentos, utilizando um fago recombinante que carrega estes genes (KUHN *et al.*, 2002); em estudos sobre a atividade metabólica de *Lactococcus lactis* no trato digestivo (DROUAULT *et al.*,

1999); em estudos da expressão regulada de genes envolvidos na utilização de xilose em *Staphylococcus carnosus* (SIZEMORE *et al.*, 1993).

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento do genoma de *Herbaspirillum seropedicae* através da identificação e da análise estrutural de genes presentes a montante do gene *nifA*.

1.6.2. Objetivos específicos

- a) Seqüenciar a região proximal da *orf4* situada a montante do gene *modE*;
- b) Identificar regiões codificadoras de proteínas e seqüências promotoras, e determinar a similaridade dos genes identificados a montante do gene *modE* em *Herbaspirillum seropedicae* com genes de outros micorganismos.
- c) Mutagenizar o gene *modE* de *Herbaspirillum seropedicae*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismos, plasmídeos e fagos

As estirpes utilizadas estão listadas na tabela 1, os plasmídeos e fago utilizados estão listados na tabela 2:

Tabela 1: Estirpes utilizadas

Estirpes	Genótipo/ Fenótipo	Referência ou fonte
<i>H. seropedicae</i>		
SmRI	<i>Nif</i> ⁺ , Sm ^r	SOUZA, 1990
<i>Escherichia coli</i>		
71-18	$\Delta(lac\ pro)\ F'[lac^qZ\ \Delta M15\ pro^+ AB]\ supE$	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
DH10B	<i>Nal</i> ^r ; <i>F'</i> [<i>proAB</i> ⁺ / <i>lacZ</i> Δ M15]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
S17.1	RP4-2 Tc :: um Km :: Tn7 <i>Tra</i> ⁺ Sm ^R <i>recA</i>	SIMON <i>et al.</i> , 1983
LE392	<i>hsdR</i> 514(<i>rk</i> ⁻ <i>mk</i> ⁺) <i>supE</i> 44 <i>supF</i> 58 <i>lacy</i> 1	STRATAGENE
DH5 α	<i>Nal</i> ^R <i>F</i> ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>endA</i> <i>recA</i> 1 <i>hsdR</i> 17 (<i>r</i> _k ⁻ <i>m</i> _k ⁺) <i>deoR</i> <i>thi</i> -1 <i>supE</i> 44 λ <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989

Tabela 2: Plasmídeos e fago utilizados

Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Referência ou fonte
pELV2B	pTZ19R :: fragmento de 3,5 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I de <i>H. seropedicae</i>	VOIGT, 2000
pELV21B	pTZ19R :: fragmento de 0,9 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> II de <i>H. seropedicae</i>	VOIGT, 2000
pELV22B	pTZ19R :: fragmento de 0,9 kb <i>Pst</i> II/ <i>Eco</i> RI de <i>H. seropedicae</i>	VOIGT, 2000
pMP220	Tc ^R , contém gene <i>lacZ</i> sem promotor	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pARS8	pELV2B, <i>modE</i> ::Tn5-B20	Este trabalho
pANG2	pMP220 :: fragmento de 0,6 Kb <i>Pst</i> II/ <i>Eco</i> RI de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pANG3	pMP220 :: fragmento de 0,6 Kb <i>Pst</i> II/ <i>Eco</i> RI/ de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pSCA2	pTZ19R :: fragmento de 1,3 Kb <i>Pst</i> II/ <i>Eco</i> RV de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pANGPK9	pMP220 :: fragmento de 1,3 Kb <i>Pst</i> II/ <i>Kpn</i> I de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pANGPK10	pMP220 :: fragmento de 1,3 kb <i>Pst</i> II/ <i>Kpn</i> I de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
Fago	Genótipo/Fenótipo	Referência
Fago λ :: Tn5-B20	Km ^R , contém gene <i>lacZ</i> sem promotor	SIMON <i>et al.</i> , 1989.

2.2. Condições de cultivo

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas nos meios Luria-Bertani Broth (LB), Luria-Bertani Ágar (LA) (SAMBROOK *et al.*, 1989), Terrific Broth (TARTOFF & HOBBS, 1987), NFDM (CANNON *et al.*, 1974), SOB e SOC (BETHESDA RESEARCH TECH., INC.), YENB ou Triptona- Broth (TB) (SAMBROOK *et al.*, 1989) a 37 °C, sob agitação quando em meio líquido e na presença dos antibióticos adequados. Soluções estoque de antibióticos (tetraciclina 10 mg/mL (Tc), ampicilina 250 mg/mL (Amp), ácido nalidíxico 10 mg/mL (Nal), canamicina 100 mg/mL (Km) e estreptomicina 80mg/mL (Sm)) foram preparadas de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

Herbaspirillum seropedicae foi cultivado em meio NFbHP (MACHADO *et al.*, 1995) a 30°C, sob agitação, quando em meio líquido e à mesma temperatura, sem agitação, quando em meio semi-sólido ou sólido.

As culturas de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C (SAMBROOK *et al.*, 1989) e as de *H. seropedicae* foram estocadas em meio NFbHPN semi-sólido.

Os meios de cultivo têm a seguinte composição:

a) Luria-Bertani Broth (LB)

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH foi corrigido para 7,0 com NaOH 1 mol/L. O meio LA foi preparado pela adição de 15 g/L de ágar ao meio líquido.

b) Terrific Broth

	gramas/litro
Bacto triptona	12,0
Extrato de levedura	24,0
Glicerol	4,0 mL/litro

c) NFDM

gramas/litro

K_2HPO_4	12,04
KH_2PO_4	3,4
$MgSO_4$	0,1
$NaMoO_4 \cdot H_2O$	0,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
Glucose	20,0

As soluções de fosfatos e de glucose foram preparados em separado e adicionados ao meio somente no momento de uso. Este meio foi suplementado com cloreto de amônio (20 mmol/L), nitrato de potássio (10 mmol/L) ou glutamina (10 µg/mL), como fontes de nitrogênio.

d) Triptona-Broth

	gramas/litro
Cloreto de sódio	8,0
Triptona	10,0

O meio TB acrescido de ágar (12 g/L ou 6 g/L) é denominado Triptona - Ágar (TA).

e) SOC

	gramas/litro
Triptona	20,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	0,5

Estes componentes foram dissolvidos em água destilada e a seguir adicionou-se 10 mL de uma solução de cloreto de potássio 250 mmol/L. O pH final da solução foi ajustado para 7,0. Antes do uso foram acrescentados cloreto de magnésio 2 mol/L e sulfato de magnésio 2 mol/L em quantidades suficientes para se obter concentrações finais de 10 mmol/L. A essa mistura foi acrescentado 20 mol/L de glucose.

f) YENB

	gramas/litro
Extrato de levedura	7,5
Extrato de carne	3,0
Bacto peptona	5,0

A utilização deste meio é apropriada para a produção de células eletrocompetentes, uma vez que é um meio com baixo teor de sal.

g) NFbHP

	gramas/litro
MgSO ₄ .7H ₂ O	$2,0 \times 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \times 10^{-1}$
CaCl ₂	$2,0 \times 10^{-2}$
Ácido nitrilo-triacético	$5,6 \times 10^{-2}$
FeSO ₄ .7H ₂ O	$2,0 \times 10^{-2}$
Malato de sódio	5,0
Biotina	$1,0 \times 10^{-4}$
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	$2,0 \times 10^{-3}$
MnSO ₄ .H ₂ O	$2,35 \times 10^{-3}$
H ₃ BO ₃	$2,8 \times 10^{-3}$
CuSO ₄ .5H ₂ O	$8,0 \times 10^{-5}$
ZnSO ₄ .7H ₂ O	$2,4 \times 10^{-4}$

Os meios NFbHP sólido e semi-sólido foram preparados pela adição ao meio líquido de 15 e 1,75 g/L de ágar, respectivamente.

Solução de fosfatos:	gramas/litro
KH ₂ PO ₄	159,7
K ₂ HPO ₄	17,8

A solução de fosfatos foi autoclavada separadamente e adicionado 50 mL/L no momento do uso.

Foi utilizada como fonte de nitrogênio, cloreto de amônio 20 mmol/L para crescimento de inóculos.

Para os ensaios de atividade de β -galactosidase das culturas de *H. seropedicae* contendo os plasmídeos pANG3, pANGPK9 e pANGPK10 foram utilizados meios de cultivo NFbHP com concentrações de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, variando de 0 a 3,5 mg/L com intervalos de 0,5 mg/L, acrescidos de glutamato de sódio 0,5 mmol/L.

Para os ensaios da atividade de nitrogenase foi utilizado o meio NFbHP acrescido de glutamato de sódio 0,5 mmol/L.

2.3. Manipulação do DNA

2.3.1. Purificação de plasmídeos pela técnica de lise alcalina

De uma cultura bacteriana cultivada até a saturação foram coletados 1,5 mL e centrifugados por 1 minuto a 13.000 rpm em centrífuga Eppendorf miniSpin. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 150 μL de solução GET (glicose 50 mmol/L; EDTA 10 mmol/L e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0). Acrescentou-se 150 μL de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%). A mistura foi homogeneizada invertendo-se o tubo de 5 a 7 vezes e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente para ocorrer a lise completa. Foram adicionados 150 μL de Kacf (acetato de potássio 3 mol/L + ácido fórmico 1,8 mol/L) e homogeneizado por inversão do tubo. O tubo foi incubado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado também por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e a ele foi acrescentado 100 μL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25 : 24 : 1 - v : v : v). Em seguida a solução foi agitada em agitador tipo Vortex e centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. À fase aquosa coletada foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos para a precipitação do DNA. O sistema foi centrifugado por mais 20 minutos, desprezado o sobrenadante e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 80%. O DNA foi, então, centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi seco a vácuo

e ressuspensão em 20 μL (para plasmídeos com alto número de cópias) ou 8 μL (para plasmídeos com baixo número de cópias) de água ultrapura e mantido em freezer.

2.3.2. Purificação de plasmídeos de células de *Herbaspirillum seropedicae*

Para a purificação de plasmídeos de *H. seropedicae* foi empregada a técnica de Kado & Liu (KADO & LIU, 1981).

De uma cultura de células de *H. seropedicae* cultivadas durante a noite foram coletados 500 μL em tubo tipo Eppendorf e centrifugados por 1 minuto a 13.000 rpm. O excesso de sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 μL de solução GET (glicose 50 mmol/L; EDTA 10 mmol/L e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0). Foram acrescentados 200 μL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0; SDS 3%; NaOH 80 mmol/L) e o sistema foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente para ocorrer a lise das células. Foram adicionados 800 μL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25 : 24 : 1 – v : v : v). O tubo foi invertido lentamente, até a emulsificação completa (cerca de 100 vezes), em seguida centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, a ele foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e a mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente para a precipitação do DNA. Em seguida o tubo foi centrifugado por mais 20 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 80% para a lavagem do DNA e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado. O DNA seco em bomba de vácuo e ressuspensão em 15 μL de água ultrapura foi mantido em freezer.

2.3.3. Purificação de plasmídeos por “fast-prep”

Uma cultura de células cultivadas durante a noite foi coletada em tubos tipo Eppendorf e centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm. O excesso de sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas no meio restante em agitador tipo Vortex.

Foi acrescentado 40 μ L de solução FSUDS (bromofenol 0,8% + ficol 10% + SDS 1% + EDTA 1,8 mmol/L + Tris-HCl 65 mmol/L + xileno cianol 0,4%) e 15 μ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25 : 24 : 1 - v : v : v). Os tubos foram submetidos a agitação em agitador tipo Vortex por 10 segundos e em seguida centrifugados por 5 minutos. O sobrenadante foi, então, aplicado em gel de eletroforese.

2.3.4. Purificação de plasmídeos para sequenciamento.

As etapas de extração, purificação e precipitação do DNA foram desenvolvidas como no item 2.3.1. O DNA foi, então, lavado com 1 mL de etanol 80%, centrifugado a 13.000 rpm, seco à vácuo e ressuspensão em 100 μ L de água ultrapura. Foi acrescentado 1 μ L de RNase 10 mg/mL e o sistema foi incubado a 37°C por 2-3 h para a degradação do RNA. Em seguida foram adicionados 50 μ L da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25: 24:1), agitado e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e a ele acrescentado 20-30 μ L de clorofórmio isoamílico. O tubo foi centrifugado por 5 minutos e coletado o sobrenadante. O DNA encontrado no sobrenadante foi precipitado com 2/3 do volume de acetato de amônio 7,5 mol/L e 2,5 volumes de etanol absoluto deixando-se em repouso a temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugação por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado 2 vezes com etanol 80% e ressuspensão em 20 μ L de água ultrapura.

2.3.5. Purificação de plasmídeos em larga escala (maxiprep)

Células de *H. seropedicae* foram cultivadas em 100 mL de meio apropriado até a saturação e centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 5 mL de solução GET (glicose 50 mmol/L; EDTA 10 mmol/L e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0). Foram adicionados 5 mL de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%) e homogeneizado cuidadosamente. Foram acrescentados 5 mL de Kacf (acetato de potássio 3 mol/L + ácido fórmico 1,8

mol/L), homogeneizado por inversão do tubo e centrifugou-se a 5.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, a ele adicionado 0,6 volume de isopropanol e incubado em banho de gelo por 10-15 minutos. O tubo foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O *pellet* foi dissolvido com 400 µL de água ultrapura adicionados em dois volumes de 200 µL e coletados em tubos estéreis tipo Eppendorf. Nestes tubos o DNA foi extraído acrescentando-se 1 volume da mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25 : 24 : 1) por duas vezes, e centrifugando-se a 13.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e a ela adicionado 1 volume de clorofórmio. O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e coletada, novamente, a fase aquosa. O DNA foi então, precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 80%, seco e dissolvido em 100 µL de água ultrapura.

2.3.6. Purificação de DNA cromossômico

Células de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP com cloreto de amônio 20 mmol/L até a saturação. Aliquotas de 2,5 mL de cultura foram concentradas por centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. As células foram ressuspensas em 500 µL de TES (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0; EDTA 20 mmol/L; NaCl 200 mmol/L) e centrifugadas novamente a 13.000 rpm por 1 minuto. Mais uma vez as células foram ressuspensas em 500 µL de TES e incubadas com lisozima 100 µg/mL a 30°C por 1 hora. Foi acrescentado SDS 1% e o sistema foi incubado a temperatura ambiente até a lise completa. Em seguida foi adicionado pronase E 100 µg/mL e os tubos foram incubados a 37°C durante a noite. O material foi, então, tratado com 500 µL de fenol equilibrado e centrifugado por 20 minutos a 13.000 rpm. A fase aquosa foi coletada, a ela foi acrescentado 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25 : 24 : 1), centrifugado por mais 20 min a 13.000 rpm e a fase aquosa, novamente coletada. Ao líquido viscoso coletado foram adicionados 500 µL de clorofórmio, centrifugado por 20 minutos a 13.000 rpm. O DNA da fase aquosa final foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, centrifugado por 15 minutos e lavado com 1 mL de etanol 80%. Os tubos foram secos ao ar por 30 minutos e o DNA foi ressuspenso num volume desejado de água ultrapura.

2.4. Eletroforese em gel de ágar ou agarose

Ágar ou agarose foram dissolvidos a quente em tampão TBE (Tris-borato 89 mmol/L, EDTA 1 mmol/L pH 8,0) em quantidade de acordo com a concentração desejada (1,0-1,5% ou 0,7-1,2%, respectivamente). A solução dissolvida foi transferida para a placa contendo o pente. Sobre o gel frio foram aplicadas as amostras de DNA em solução FSUDS (azul de bromofenol a 0,25% (p/v), xileno cianol a 0,25% (p/v), Ficoll a 25% (p/v), SDS a 0,5% (p/v), Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 e EDTA 1 mmol/L pH 8,0). A corrida foi conduzida em cuba de eletroforese com tampão TBE sob uma voltagem de 10-70 V. Após a corrida o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e, em seguida, visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

2.5. Transformação bacteriana por choque térmico

2.51. Preparo de células competentes por tratamento com TSS e transformação por choque térmico

As células submetidas a transformação por choque térmico foram preparadas por tratamento com TSS de acordo com Chung *et al.* (1989).

Para a preparação de células competentes das estirpes de *E. coli*, uma colônia, isolada anteriormente em placa, foi inoculada em meio LB com os antibióticos apropriados e cultivada a 37°C sob agitação durante a noite. Desta cultura foi utilizado 1 mL para inocular 100 mL de meio LB. As células foram cultivadas a 37°C sob agitação até uma D.O.₆₀₀ 0,5 – 0,7. A cultura foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm, 4°C por 4 minutos. As células, então, foram ressuspensas em 1 mL de TSS (meio LB 85%, Polietilenoglicol 8000 10% (p/v), DMSO 7% (v/v), cloreto de magnésio 10 mmol/L pH 6,5) previamente esterilizado por filtração, distribuídas em tubos tipo Eppendorf em alíquotas de 100 µL e mantidas a -70°C.

Para a transformação das estirpes de *E. coli*, a quantidade desejada de DNA plasmidial ou da reação de ligação foi misturada a uma alíquota de 100 µL de

células competentes, previamente descongeladas em banho de gelo. A mistura foi incubada por 1 hora em banho de gelo, mergulhada em banho-maria a 42°C por 2 minutos, para o choque térmico, e incubada novamente em banho de gelo por 10 minutos. Foi acrescentado 1 mL de meio SOC à mistura e incubado em estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida as células foram plaqueadas em meio LA com os antibióticos apropriados e incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias resultantes foram analisadas para a presença de plasmídeos.

2.5.2. Preparo de células competentes por tratamento com cloreto de cálcio e transformação por choque térmico

As células competentes obtidas por tratamento com cloreto de cálcio foram preparadas de acordo com Maniatis *et al.* (1982).

Para a preparação das células competentes, 20 mL de meio LB pré-aquecido a 37°C foram inoculados com 80 µL de uma cultura saturada de *E. coli* e incubados a 37°C sob agitação por 2 a 3 horas (D.O.₆₀₀ de 0,3-0,5). A cultura foi resfriada em banho de gelo durante 10 minutos e as células coletadas por centrifugação a 4.800 rpm, 4°C por 5 minutos. As células foram, então, ressuspensas em 10 mL de tampão de transformação (Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 e CaCl₂ 50 mmol/L) estéril, incubadas em gelo por 30-40 minutos e novamente coletadas por centrifugação. Finalmente as células foram ressuspensas em 1,2 mL de tampão de transformação e aliqüotadas (0,2 mL) em tubos tipo Eppendorf previamente gelados.

Para a transformação a quantidade desejada de DNA plasmidial ou da mistura de ligação foi adicionada a uma alíquota de 0,2 mL de células competentes. Esta mistura foi homogeneizada, incubada em gelo por 30-40 minutos e submetida ao choque térmico como descrito no item 2.5.1.

2.6. Transformação bacteriana por eletroporação

2.6.1. Preparo de células eletrocompetentes

As células eletrocompetentes das estirpes de *E. coli* foram preparadas de acordo com Robey *et al.* (1996).

Para esta preparação, células de *E. coli* foram cultivadas durante a noite em meio líquido YENB. Desta cultura foi utilizado 0,5-1,0 mL para inocular 100 mL de meio YENB. Este inóculo foi cultivado a 37°C sob agitação até uma D.O.₆₀₀ de 0,5 a 0,9. As células foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com 10 mL de água ultrapura estéril gelada e uma vez com 2 mL de glicerol 10% gelado repetindo as etapas de centrifugação, como já descrito. As células foram ressuspensas num volume final de 200 –300 µL de glicerol 10% gelado, aliquotadas e mantidas a -70°C.

Para a preparação de células eletrocompetentes de *H. seropedicae*, as culturas foram cultivadas a 30°C sob agitação em meio NFbHP com a adição de 20 mmol/L de cloreto de amônio, por aproximadamente 18 h, até o estado estacionário. Foram inoculados 50 µL desta cultura em 50 mL do mesmo meio em frasco de 250 mL e crescido a 30°C sob agitação até a saturação. A cultura foi centrifugada a 3.000 rpm, 4°C, por 10 minutos, o sobrenadante descartado, as células lavadas com água ultrapura gelada e novamente centrifugadas nas mesmas condições por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas em glicerol 10% e centrifugadas novamente nas mesmas condições por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em glicerol 10% e aliquotadas.

2.6.2. Eletroporação

Para a eletroporação das estirpes de *E. coli* 1 µL de DNA plasmidial foi adicionado a 20 µL de células eletrocompetentes e a mistura foi cuidadosamente transferida para uma cuba de eletroporação. As células foram submetidas a um

choque elétrico 10 kV/cm (4 k Ω de resistência, após acúmulo de 350–400 μ F de carga), em seguida ressuspensas em 1 mL de meio LB ou SOC e incubadas a 37 °C por 1 h. Posteriormente, as células foram plaqueadas em meio LA seletivo contendo os antibióticos apropriados e após incubação a 37 °C durante 16–24 horas as bactérias transformantes foram coletadas e analisadas quanto à presença dos plasmídeos.

Para a eletroporação de *H. seropedicae* 3-5 μ L de DNA plasmidial, obtido por minipreparação (2.3.1) ou maxipreparação de plasmídeos (2.3.5), foi adicionado a 25-40 μ L de células eletrocompetentes. A mistura foi transferida para uma cuba de eletroporação e as células submetidas a uma descarga elétrica 10 kV/cm (4 k Ω de resistência, após acúmulo de 280-350 μ F de carga). Em seguida foram ressuspensas em 1mL de meio NFbHP com 20 mmol/L de cloreto de amônio e incubadas a 30 °C sob agitação por 6 ou 18 h para sua recuperação. Após a incubação as células foram plaqueadas em meio NFbHP sólido contendo amônia, o antibiótico estreptomicina (Sm, 80 μ g/mL) e os antibióticos apropriados aos plasmídeos que foram inseridos nas células [canamicina (Km, 1000 μ g/mL) ou tetraciclina (Tc, 10 μ g/mL)] e incubadas novamente, a 30°C por 48-72 h. As colônias resultantes foram coletadas e analisadas quanto a presença de plasmídeos ou quanto a recombinação homóloga do plasmídeo inserido com o cromossoma.

2.7. Clivagem do DNA por enzimas de restrição

As amostras de DNA foram clivadas com 1-2 unidades de enzima de restrição em um volume final de reação de 10-20 μ L, por 2-3 horas à temperatura e em tampão adequados para a atividade da enzima, conforme indicado pelos fabricantes (Life Technologies, Amersham Pharmacia Biotech ou New England Biolabs).

2.8. Ligação do DNA

Para clonagem de fragmentos de DNA foram preparadas misturas de ligação contendo vetor e inserto numa proporção aproximada de 1:5 (v/v), em um volume final variável (10-30 μ L). Vetor, inserto e água ultrapura q.s.p. foram misturados e incubados a 65 °C por 5 minutos. Em seguida, a mistura foi incubada em banho de gelo por 5 minutos. Foi adicionado o tampão para a enzima ligase (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,6; MgCl₂ 10 mmol/L, DDT 1 mmol/L, ATP 0,5 mmol/L e PEG 5%) e a enzima T4-DNA ligase (0,5 a 1,0 U). A mistura de ligação completa foi incubada a 18 °C por 24-48 h e eletroporada em células competentes das estirpes *E. coli* 71.18, *E. coli* DH5 α ou *E. coli* DH10B. Estas células foram plaqueadas em meio LA na presença dos antibióticos apropriados. Para confirmar a ocorrência de clones, colônias isoladas foram coletadas e os plasmídeos foram purificados e analisados por eletroforese.

2.9. Obtenção das fusões transcricionais com o gene *lacZ*

O fragmento *EcoRI/PstI* do plasmídeo pELV22B (Fig.2), que contém 585 nucleotídeos da região a montante ao gene *modE* de *H. seropedicae*, foi clonado no vetor de fusão-*lacZ* sem promotor, pMP220 (anexo I). O fragmento *EcoRV/PstI* do plasmídeo pELV2B (Fig. 2), que contém 1266 nucleotídeos da região a montante ao gene *modE*, foi clonado nos sítios *SmaI/PstI* do vetor pTZ19R (anexo II). A partir do clone obtido foi extraído um fragmento *KpnI/PstI* de 1,3 kb (contendo a mesma região), que foi então clonado no vetor pMP220. Os fragmentos para clonagem foram obtidos através de reações de restrição (2.7) do plasmídeo pELV2B e as clonagens foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose.

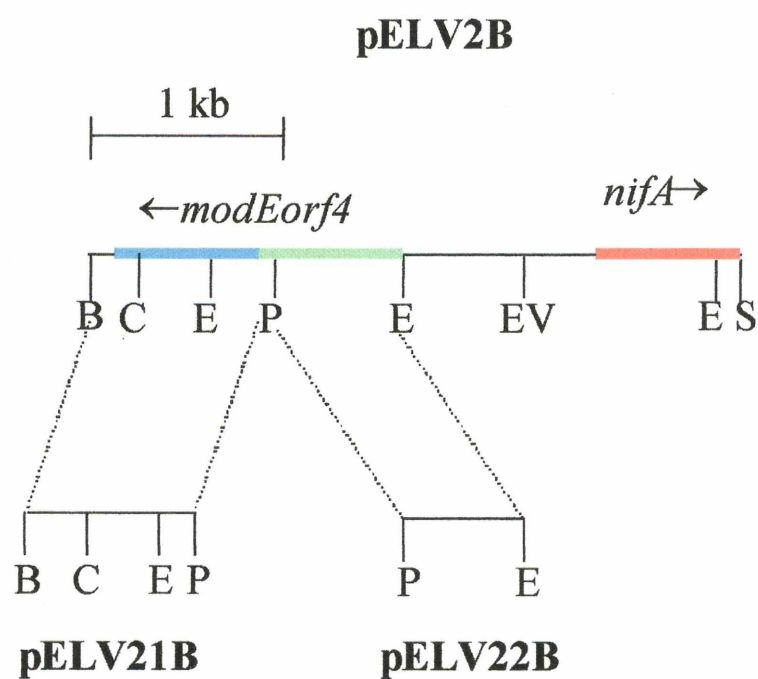


Figura 2. Mapa de restrição do plasmídeo pELV2B e de plasmídeos derivados. O plasmídeo pTZ19R é o vetor de pELV2B, pELV21B e pELV22B (VOIGT, 2000). A região proximal do gene *nifA* está representada por um traço vermelho. O gene *modE* está representado em azul e a *orf4* está representada em verde. As setas indicam a direção de transcrição dos genes *nifA*, *modE* e *orf4*. São indicados os sítios *Bam*HI (B), *Cla*I (C), *Eco*RI (E), *Pst*I (P), *Eco*RV (EV) e *Sal*I (S).

2.10. Amplificação do DNA

A amplificação do DNA realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo Kocher & Wilson (1991), em termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600. Os programas de PCR possuem três etapas básicas repetidas de 30 a 35 vezes: desnaturação do DNA molde (94-96 °C), anelamento do *primer* e amplificação (72 °C). A temperatura de anelamento do *primer* é calculada considerando que cada par AT contribui em 2 °C para a temperatura de fusão do DNA dupla fita, enquanto um par GC contribui em 4 °C (DIEFFENBACH & DVEKSLER, 1995).

As reações de amplificação por PCR foram feitas num volume final de 25 µL com os seguintes reagentes: tampão de PCR (1x), MgCl₂ (1,5 mmol/L), dNTP (0,075 mmol/L), *primer* universal (0,2 pmol/ µL), *primer* reverso (0,2 pmol/ µL), *Taq* polimerase (1,2 µL) e o DNA molde (1µL)(2.3.4). Em seguida foram levadas ao termociclador e submetidas aos seguintes ciclos de temperatura: 95 °C, 4 minutos (1 ciclo de desnaturação); 95 °C, 45 segundos, 55 °C, 45 segundos, 72 °C, 1 minuto (30 ciclos de amplificação) e 72 °C, 5 minutos (1 ciclo de preenchimento de pontas). O produto de PCR foi então precipitado com acetato de amônio 2,5 mol/L e dois volumes de etanol absoluto. A mistura foi agitada, incubada em banho de gelo por 20 minutos e centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado duas vezes com 200 µL de etanol 70%, seco à vácuo e ressuspenso em 5-6 µL de água ultrapura.

2.11. Seqüenciamento de DNA

Para o seqüenciamento foi utilizado o DNA inserto do plasmídeo pELV22B que contém o gene *orf4* e do plasmídeo pARS8 que contém o gene *modE* mutagenizado (tabela 2).

O DNA obtido do plasmídeo pELV22B foi amplificado por PCR (2.10), purificado e seqüenciado pelo método de terminação de cadeia (SANGER *et al.*, 1977), utilizando dideoxiterminadores (ddNTPs) fluorescentes, separação em

eletroforese de placa e detecção do fluoróforo após excitação com laser em seqüenciador automático ABI 377 da Applied Biosystems.

O DNA obtido do plasmídeo pARS8 através do método de preparação de plasmídeos para seqüenciamento (2.3.4) foi submetido a reação de seqüenciamento, purificado e seqüenciado pelo mesmo método citado acima.

As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com as recomendações do "kit" de seqüenciamento. Em um sistema de reação de 20 µL, foram empregados 1-2 µL de solução de DNA molde (concentração estimada entre 200-400 ng por comparação com DNA plasmidial de concentração conhecida), 0,5 pmol/µL de *primer* universal ou reverso, 4 µL de "BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix" (Perkin-Elmer, Foster, EUA) ou "DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE" (Amersham Pharmacia Biotech) e água ultrapura suficiente para 20 µL. O DNA foi amplificado em termociclador, sendo submetido aos seguintes ciclos de temperatura: 95°C, 5 min (1 ciclo); 95 °C, 30 s; 50 °C, 15 s; 60 °C, 1 min (30 ciclos). O sistema de reação foi purificado acrescentando-se 2 µL de acetato de sódio 3 mol/L pH 5,2 e 50 µL de etanol absoluto (2,5 volumes) e incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi transferido para um tubo de 500 µL e centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com etanol 80%. Após a centrifugação o etanol foi descartado, as amostras foram secas ao ar e seqüenciadas.

2.12. Preparo e titulação de estoque de fago λ::Tn5-B20

Durante a infecção de *E. coli* por fago λ::Tn5-B20, a proteína bacteriana a qual o fago adsorve é codificada pelo operon *mal* que é induzido por maltose (DAVIS *et al.*, 1980). Assim, células cultivadas na presença de maltose adsorvem o fago mais facilmente. Células de *E. coli* estirpe LE392 foram cultivadas em 10 mL de meio TB suplementado com maltose 0,2% e tiamina 5 µg/mL. Após atingir a saturação, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 1 mL de solução de MgSO₄ 10 mmol/L.

O estoque do fago λ ::Tn5-B20 foi diluído exponencialmente (10^{-1} a 10^{-8}) em MgSO_4 10 mmol/L. Alíquotas de 100 μL de cada diluição foram misturadas a 5 μL da suspensão de células preparadas como descrito acima e a 100 μL da solução de MgSO_4 , constituindo sistemas de infecção com um volume final de 205 μL . Estes sistemas foram incubados a 37 °C por 30 minutos para permitir a adsorção do fago. Após esta incubação, cada sistema de infecção foi misturado a 3 mL de meio TA semi-sólido (45 °C) e homogeneizado. Esta mistura foi espalhada sobre placas com meio TA ou LA, preparadas anteriormente. As placas foram incubadas a 37 °C por 14 -16 h.

As partículas de fago λ ::Tn5-B20 liberadas durante a lise das células foram coletadas banhando-se as placas com 5 mL de tampão SM (NaCl 0,58%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; Tris-HCl 0,05 mol/L; gelatina 0,01%), por 3-4 horas a 5 °C, com leve agitação manual intermitente. A suspensão de partículas foi transferida para um frasco de vidro estéril. A coleta foi realizada duas vezes e ao volume final foram adicionadas duas gotas de clorofórmio. A suspensão foi estocada a 5 °C.

Para a titulação do fago λ ::Tn5-B20 células de *E. coli* LE392 foram tratadas com MgSO_4 10 mmol/L e infectadas com a suspensão do fago em diluições de 10^{-2} a 10^{-10} . O título do estoque foi determinado pelo produto: número de placas de lise x fator de diluição. Cada placa de lise formada foi considerada uma “unidade formadora de placa de lise” (UFP). O título do fago corresponde ao número de UFPs presentes em um mililitro de suspensão deste fago em estoque (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.13. Mutagênese de plasmídeos por inserção do transposon

O gene *modE* de *H. seropedicae* está contido nos plasmídeos pELV2B e pELV21B. O plasmídeo a ser mutagenizado (pELV2B), por inserção aleatória do transposon Tn5-B20 (SIMON *et al.*, 1989) a partir de infecção com fago λ ::Tn5-B20 (de BRUIJIN, 1984), foi introduzido em células de *E. coli* S17.1 por transformação (2.6). O tratamento das células de *E. coli* S17.1 (pELV2B) foi feito como descrito para as células de *E. coli* LE392 no item 2.12. As células infectadas foram

plaqueadas diretamente em meio LA contendo os antibióticos específicos para a estirpe hospedeira (Sm^{30}), o plasmídeo (Amp^{250}) e o transposon (Km^{50}), respectivamente. As colônias de células infectadas crescidas nas placas de meio seletivo (LA, Sm^{30} , Amp^{250} , Km^{50}) foram coletadas e reunidas em uma suspensão. Esta suspensão de células constituiu o banco de células mutagenizadas por $\lambda::\text{Tn5-B20}$. Neste banco existiam células com o transposon inserido no cromossomo e células com o transposon inserido no plasmídeo (pELV2B). A fim de selecionar células que possuíam apenas o transposon inserido nos plasmídeos estes foram purificados (2.3.1), a partir das células do banco, e usados para transformar (2.6) outras células de *E. coli* S17.1. Após a eletroporação estas células foram plaqueadas em meio LA com os antibióticos Sm^{30} , Amp^{250} e Km^{50} . As células crescidas nestas placas foram analisadas para a presença dos plasmídeos por eletroforese e pela clivagem dos plasmídeos com enzimas de restrição para localizar o ponto de inserção do transposon $\lambda::\text{Tn5-B20}$.

2.14. Obtenção de mutantes cromossômicos

O plasmídeo que continha o gene *modE* mutagenizado (pARS8) foi selecionado e transferido por transformação (2.6) para células de *H. seropedicae* estirpe SmR1. As colônias resistentes a Km foram coletadas e seu DNA cromossômico purificado (2.3.6) e submetido a hibridização (2.14) contra sonda específica para confirmar a recombinação entre o gene *modE* mutagenizado, presente no plasmídeo, e o cromossomo de *H. seropedicae*.

2.15. Hibridização de DNA

O DNA cromossômico dos mutantes foi purificado (2.3.6), clivado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I e submetido a eletroforese em gel de agarose. O DNA foi transferido para membrana de nylon e hibridizado contra sonda marcada com ^{32}P . A sonda utilizada foi o plasmídeo pARS8.

2.15.1. Transferência do DNA para a membrana de nylon

Após a eletroforese o gel contendo as amostras de DNA cromossômico de *H. seropedicae* clivado com as enzimas de restrição foi mergulhado em água destilada onde ficou por 5 minutos. A água foi substituída por uma solução de HCl 0,25 mol/L onde o gel ficou incubado por 7 minutos, em seguida esta solução foi descartada. Uma solução desnaturante (NaCl 1,5 mol/L, NaOH 0,5 mol/L) foi adicionada sobre o gel, o sistema incubado por 10 minutos e a solução descartada (esta etapa foi realizada duas vezes seguidas). A solução desnaturante foi retirada e adicionada a solução neutralizante (NaCl 1,5 mol/L, Tris-HCl 0,5 mol/L pH 7,5 e EDTA 0.001 mol/L). Após incubação por 30 minutos esta solução foi descartada e o gel foi mergulhado em SSC 15X (NaCl 2,25 mol/L, citrato trissódico.2H₂O 0,225 mol/L) pH 7,5 onde ficou por 10 minutos. Foi construído um sistema de transferência de acordo com Ausubel *et al.* (1999). O sistema foi incubado por 24 horas. Após a transferência a membrana de nylon foi seca em fluxo laminar e o DNA foi fixado a ela por exposição a luz UV por 4 minutos.

2.15.2. Marcação da sonda

As sondas consistem de fragmentos de DNA plasmidial obtidos por lise alcalina e clivagem com enzimas de restrição e marcados com [α ³²P]dCTP. A marcação foi feita através de um sistema de reação (volume final de 25 μ L) constituído por 10 μ L de DNA do plasmídeo pARS8, clivado com as enzimas *Bam*HI e *Sa*II, e 7,5 μ L de água ultrapura. O sistema foi fervido por 5 minutos, para que ocorresse a desnaturação do DNA, e colocado no gelo em seguida. Foi acrescentado 5 μ L de tampão OLB que consiste numa mistura das soluções A, B e C na proporção 2 : 5 : 3 (solução A: Tris-HCl 1,25 mmol/L, MgCl₂ 0,125 mmol/L, 18 μ L de 2-mercaptoetanol, 5 μ L de cada um dos dinucleotídeos dATP, dTTP e dGTP; solução B: HEPES 2M ou MOPS 2M; solução C: hexadeoxinucleotídeos 90 unidades DO por mL), 1 μ L de BSA 10 mg/mL, 0,5 μ L de enzima Klenow 5 U/ μ L e 1 μ L de [α

^{32}P]dCTP. O sistema foi incubado por 18-24 h a temperatura ambiente e o volume foi aumentado para 100 μL .

2.15.3. Pré-hibridização e hibridização

Para realizar a pré-hibridização a membrana foi mergulhada em 40 mL de uma solução composta por tampão fosfato 0,5 mol/L pH 8,0 e SDS 5%. A este sistema foi acrescentado 400 ng/mL de DNA de salmão previamente fervido por 5 minutos e resfriado em gelo. O sistema foi incubado por 4h a 60°C no forno de hibridização. O processo de pré-hibridização foi realizado para bloquear a membrana impedindo que a sonda marcada ligue-se inespecificamente a ela.

Em seguida, para a hibridização, foi acrescentada a sonda, previamente fervida e resfriada em gelo. O sistema foi incubado por 24 h a 60 °C no forno de hibridização. Após a incubação a membrana foi lavada por 15 minutos numa solução de SSC 0,5x (NaCl 0,075 mol/L, citrato trissódico.2H₂O 0,0075 mol/L) mais SDS 0,1% e exposta a um filme de raio X por 24-48 h.

2.16. Determinação da atividade de β -galactosidase

A atividade da enzima β -galactosidase foi determinada conforme descrito por Miller (1992).

Para a determinação da atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae* as células de *H. seropedicae* SmRI, *H. seropedicae* (pM220), *H. seropedicae* (pANGPK9), *H. seropedicae* (pANGPK10) e *H. seropedicae* (pANG3) foram cultivadas em meio NFbHP, acrescido de glutamato de sódio 0,5 mmol/L e concentrações variadas de Na₂MoO₄.2H₂O (2.2) até uma D.O._{600nm} de 1,0-1,5. Cem microlitros de cada cultura foram transferidos para tubos plásticos de 2,0 mL, aos quais adicionou-se 25 μL de clorofórmio e 900 μL de uma mistura de tampão Z, β -mercaptoetanol 0,39% e SDS 0,0027%. Após agitação vigorosa os tubos foram incubados a 30 °C em banho-maria por 5 minutos. Foram acrescentados 200 μL de

ONPG 4 mg/mL que foi utilizado como substrato para a enzima β -galactosidase. A reação foi interrompida com 500 μ L de Na_2CO_3 após a observação de coloração amarela. O tempo foi registrado e a absorbância foi determinada em 420 nm. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). A atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae* foi reportada como nmol de o-nitrofenol.min⁻¹.mg prot⁻¹

Para a determinação da atividade de β -galactosidase em *E. coli* as células foram cultivadas em meio LB até uma D.O._{600nm} de 1,0-1,5 e procedeu-se como descrito para *H. seropedicae*. Para as estirpes de *E. coli*, a atividade de β -galactosidase foi reportada em Unidades Miller, calculadas da seguinte forma:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \times \frac{\text{D.O.}_{420\text{nm}} - (1,75 \times \text{D.O.}_{550\text{nm}})}{\text{Tempo}(\text{min}) \times \text{vol}(\text{mL}) \times \text{D.O.}_{600\text{nm}}}$$

2.17. Determinação da atividade de nitrogenase

A atividade de nitrogenase em *H. seropedicae* SmRI e *H. seropedicae* (pARS8), clones 28 e 34, foi determinada pelo método de redução do acetileno (DILWORTH, 1966; SCHÖLLHORN & BURRIS, 1967). Para os ensaios as estirpes foram cultivadas em meio NFbHP semi-sólido acrescido de 0,5 mmol/L de glutamato de sódio e dos antibióticos apropriados. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Mutagênese do gene *modE* de *Herbaspirillum seropedicae*

Células da estirpe S17.1 de *E. coli* foram transformadas por eletroporação (2.6) com o plasmídeo pELV2B que contém o gene *modE* de *H. seropedicae*, resultando em 188 colônias. A transformação foi confirmada por purificação dos plasmídeos de 10 colônias transformantes *E. coli* S17.1 (pELV2B), seguida de eletroforese, na qual os plasmídeos dos transformantes foram comparados com o plasmídeo controle pELV2B (dados não mostrados). Duas destas colônias, escolhidas ao acaso, foram estocadas em glicerol.

Para mutagenizar o gene *modE*, células da estirpe *E. coli* S17.1 (pELV2B) foram transfectadas com o fago λ ::Tn5-B20 (2.13) tendo em vista a inserção aleatória do transposon Tn5-B20 no gene *modE*. O título do fago foi 81×10^8 UFPs (2.12). Das células resultantes da infecção foram extraídos os plasmídeos por lise alcalina e estes foram utilizados para transformar outras células da estirpe S17.1 (2.6) com o objetivo de selecionar células que possuísem o transposon inserido apenas no plasmídeo. Da transformação resultaram 51 transformantes *E. coli* S17.1(pELV2B::Tn5-B20) cuja seleção foi realizada na presença de antibióticos apropriados e sua confirmação feita por eletroforese. Estas 51 colônias foram submetidas a extração dos plasmídeos que foram clivados com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Pst*II e analisadas quanto a seu perfil eletroforético, para localizar o ponto de inserção do transposon. Foram utilizadas estas enzimas porque, de acordo com o mapa de restrição do plasmídeo pELV2B (Fig. 2), o gene *modE* situa-se no fragmento *Bam*HI/*Pst*II de cerca de 0,9 kb. Esta análise revelou uma mudança no perfil eletroforético do clone nº 8 o que indicou a provável inserção do transposon no fragmento citado (Fig. 3). A linha 2 mostra o perfil eletroforético do plasmídeo controle pELV2B clivado com as enzimas *Bam*HI/*Pst*II, no qual observa-se uma banda de 0,9 kb correspondente ao fragmento onde situa-se o gene *modE* e a linha 3 mostra o perfil do transformante nº 8 onde observa-se o desaparecimento dessa banda e o surgimento de uma outra de maior peso molecular. Para uma análise mais minuciosa foram realizadas outras restrições com as enzimas *Cla*I e *Eco*RI, e

também com as mesmas enzimas isoladamente. O perfil demonstrou mais uma vez a provável inserção do transposon no gene *modE*. Quando o plasmídeo mutagenizado (pELV2B::Tn5-B20) foi clivado com a enzima *ClaI* observou-se uma mudança no perfil eletroforético quando comparado ao plasmídeo controle (pELV2B). Quando o plasmídeo controle foi clivado com as enzimas *ClaI* e *EcoRI* observou-se a presença de uma banda de cerca de 0,4 kb, onde está localizado parte do gene *modE*. Esta banda desaparece no plasmídeo mutagenizado quando ele é clivado com as mesmas enzimas e surge uma banda de aproximadamente 5,5 kb demonstrando a provável inserção do transposon Tn5-B20 no gene *modE* (Fig.4).

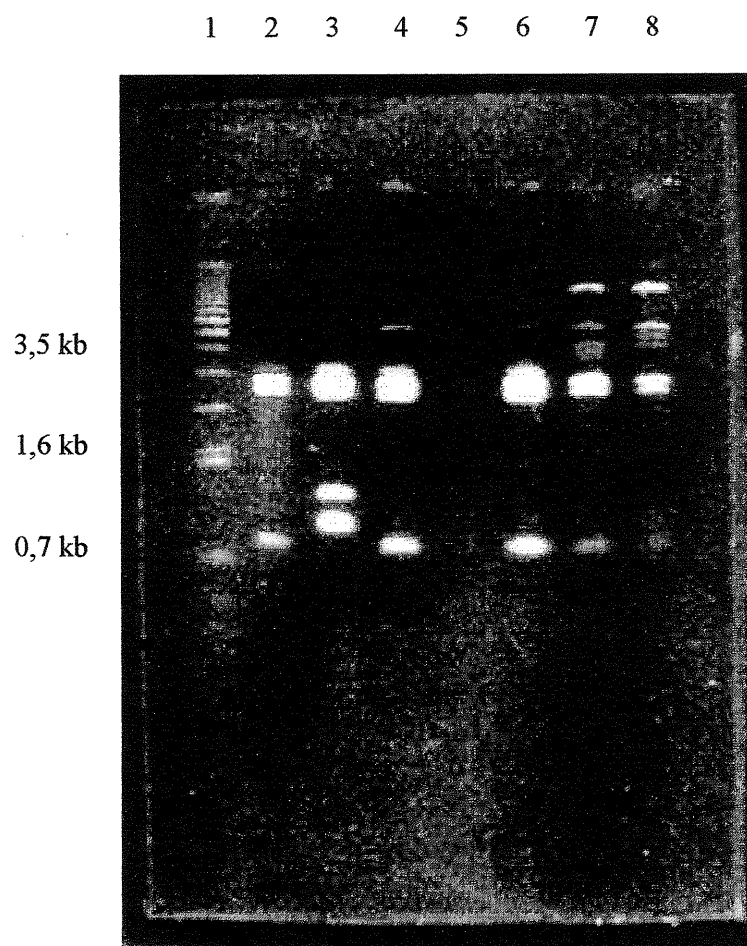


Figura 3. Perfil eletroforético dos transformantes *E. coli* S17.1 (pELV2B::Tn5-B20). A linha 1 mostra o marcador de peso molecular (pCB10 e pBR322 clivados com a enzima *Hind*III). A linha 2 mostra o plasmídeo controle pELV2B clivado com as enzimas *Bam*HI/*Pst*I. As linhas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostram seis transformantes (*E. coli* S17.1 (pELV2B::Tn5-B20)). A linha 3 mostra uma mudança no perfil eletroforético do transformante n°. 8 quando comparado ao controle.

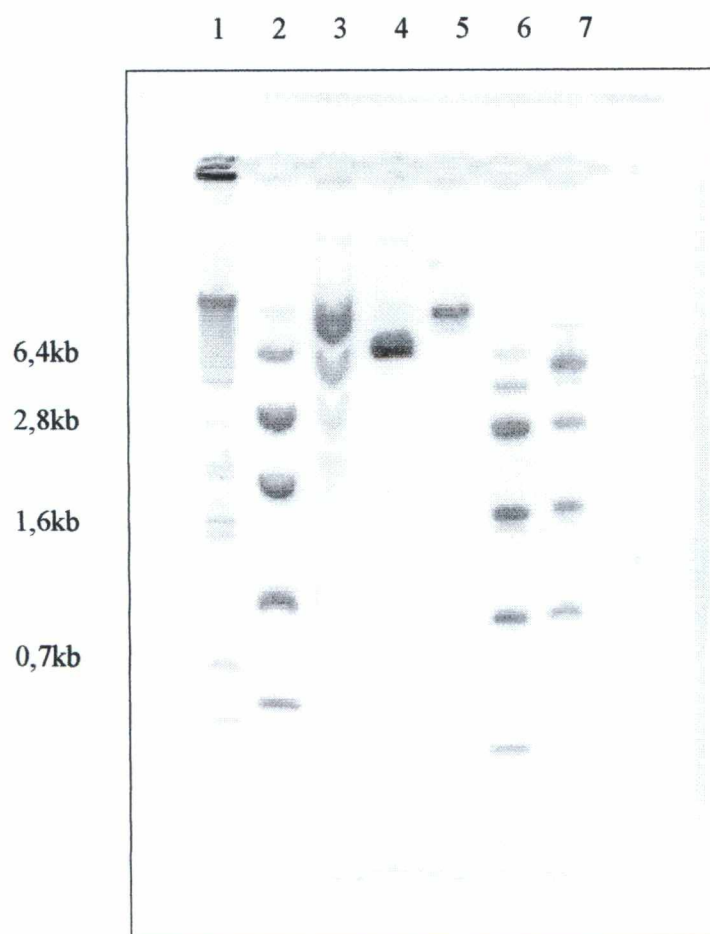


Figura 4. Perfil eletroforético do transformante nº8 (*E. coli* S17.1(pELV2B::Tn5-B20)). A linha 1 mostra um marcador de peso molecular (pCB10 e pBR322 clivados com a enzima *HindIII* e *HinfI*, respectivamente). As linhas 2 e 3 mostram, respectivamente, o plasmídeo controle (pELV2B) e o plasmídeo mutagenizado (pELV2B::Tn5-B20) clivados com a enzima *EcoRI*. As linhas 4 e 5 mostram o plasmídeo controle e o plasmídeo mutagenizado, respectivamente, clivados com a enzima *ClaI*. As linhas 6 e 7 mostram, respectivamente, a clivagem parcial do plasmídeo controle e do plasmídeo mutagenizado com as enzimas *ClaI* e *EcoRI*.

A inserção do transposon Tn5-B20 também foi confirmada através do seqüenciamento do plasmídeo mutagenizado (Fig. 5) e posterior comparação da seqüência de nucleotídeos obtida com o banco de dados através do programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Esta comparação revelou 100% de identidade com o gene *modE* de *H. seropedicae* e 96% de identidade com a região IS50L do transposon Tn5 de *E. coli*. O plasmídeo mutagenizado foi denominado pARS8.

```

TACCGGGGATCCGGCACTTGACCCTGACACACTGGTGTGTCAGCAACCCAGA      50
ATGAAGGATGACCGCAGTAGGTAATCAATCCTGCTGCACGGCCACCATCA      100
CTGCATACGCCTTGAAGACGGCGGTAGCGGTCTGCCCAGCCGACCGCCAGCGAC      150
AGCGCATCGATGGCGTCATTGGTTCAGGCTGGCGGTCATACAGGCGCCGCC      200
AGGCAAGGTCAACACCACAAGCGACGATACCGCGCCACGCTCTACGCGCG      250
AGACCGTGCCTTCAAACCTGATTGCGTGCCGAGAGGGAAAAACCGGCAAAA      300
TCGGTGACCAGCACCACCGCCGAGGACTTGATCCTGACTCTTATACACAA      350
GTAGCGTCCTGAACGGAACCTTTCCCGTTTCCAGATCTGATCTTCCATGT      400
GAACTCCTA      409

```

Figura 5. Seqüenciamento do inserto *Bam*HI/*Sal*I mutagenizado do plasmídeo pARS8. A seqüência em preto indica a porção final do gene *modE* e um fragmento do transposon Tn5-B20 inserido no gene. As regiões sublinhadas indicam os sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI (GGATCC) e *Cl*I (ATCGAT), em vermelho está indicado o códon de término de tradução para o gene *modE*. Em azul está representada a seqüência parcial correspondente ao transposon.

Para verificar a orientação do transposon inserido no gene *modE*, o plasmídeo pARS8 foi clivado com as enzimas *Bam*HI, *Xho*I, *Bgl*II, *Bam*HI/*Xho*I e *Bam*HI/*Bgl*II. A soma dos fragmentos obtidos foi de aproximadamente 10,5 kb diferente da esperada que seria 14,4 kb indicando que o plasmídeo está incompleto. De acordo com o mapa de restrição do transposon Tn5-B20, inserido no gene *modE* (Fig. 6), a análise do perfil eletroforético demonstrou a presença dos fragmentos *Bgl*II/*Bgl*II de 2,0 kb e *Xho*I/*Xho*I de aproximadamente 4,0 kb, o que indica que esta região do transposon está intacta. A ausência do fragmento *Bam*HI/*Xho*I de aproximadamente 3,0 kb indica que a região que compreende o gene *lacZ* no transposon está incompleta (Fig. 7).

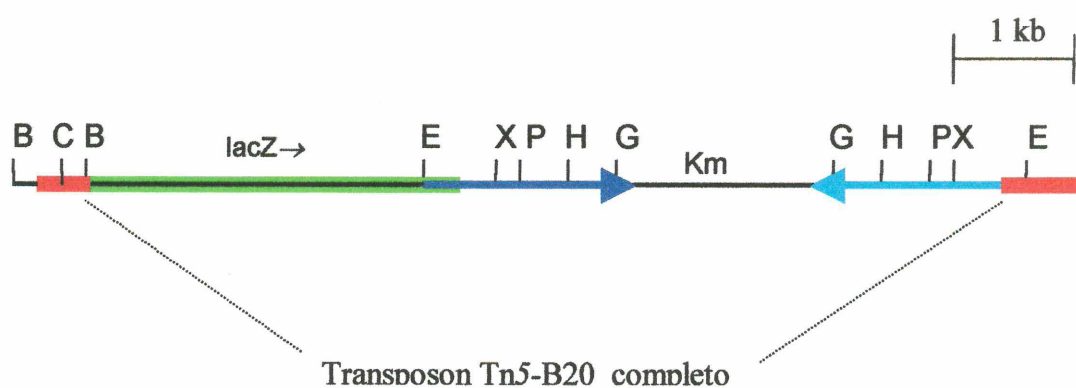


Figura 6. Esquema da inserção do transposon Tn5-B20 no gene *modE*. Em azul escuro está indicada a região IS50L. A seta azul claro indica a região IS50R. Em verde está indicado o gene *lacZ* e a seta indica o sentido de sua transcrição. Em vermelho está indicado o gene *modE*. Estão indicados os sítios *Bam*HI (B), *Cla*I, *Eco*RI (E), *Xho*I (X), *Pst*I (P), *Hind*III (H), *Bgl*II (G).

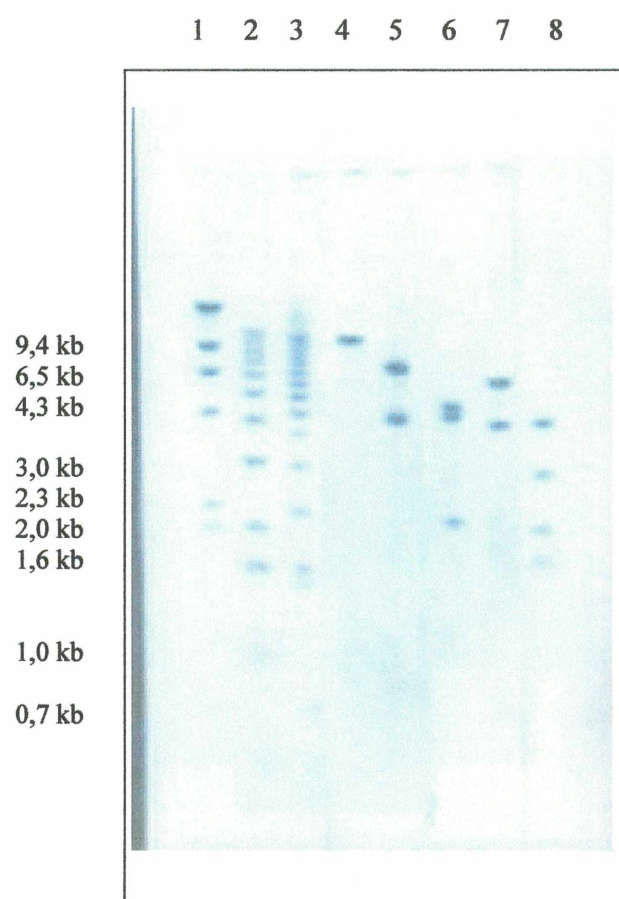


Figura 7. Perfil eletroforético do plasmídeo pARS8. A linha 1 mostra o marcador λ -HindIII, a linha 2 o marcador 1 kb DNA ladder e a linha 3 o marcador pCB10/pBR322. As linhas 4, 5, 6, 7 e 8 mostram o plasmídeo pARS8 digerido com *Bam*HI, *Xho*I, *Bgl*II, *Bam*HI/*Xho*I e *Bam*HI/*Bgl*II, respectivamente.

3.1.1. Obtenção de mutante cromossômico

Para a obtenção do mutante cromossômico *modE*⁻, células de *H. seropedicae* foram transformadas com o plasmídeo pARS8 (2.6) e selecionadas em meio apropriado com canamicina (1000 µg/mL) que é a marca de resistência do transposon. Foram obtidas 24 colônias das quais foi purificado o DNA genômico (2.3.6) e hibridizado contra sonda específica, plasmídeo pARS8 clivado com as enzimas BamHI/SalI (2.15.2). A hibridização indicou, nas 24 colônias analisadas, a provável existência de mutantes com simples recombinação, ou seja, possuindo uma cópia do gene *modE* interrompido pela inserção do transposon e uma cópia do mesmo gene intacto. Destas 24 colônias estão mostrados, abaixo, os resultados da hibridização de 9 delas (Fig. 8). Os resultados demonstram a presença do gene *modE* intacto tanto na estirpe selvagem como nos clones obtidos.

3.1.2. Atividade de nitrogenase dos mutantes simples-recombinantes

Das 24 colônias, cuja hibridização do DNA demonstrou serem prováveis mutantes com simples recombinação, foram escolhidas aleatoriamente duas delas. Estas colônias denominadas 28 e 34, juntamente com o controle *H. seropedicae*, foram ensaiadas para a atividade de nitrogenase. Os resultados para as colônias citadas foram semelhantes aos do controle indicando que não houve comprometimento do processo de fixação de nitrogênio nestes mutantes.

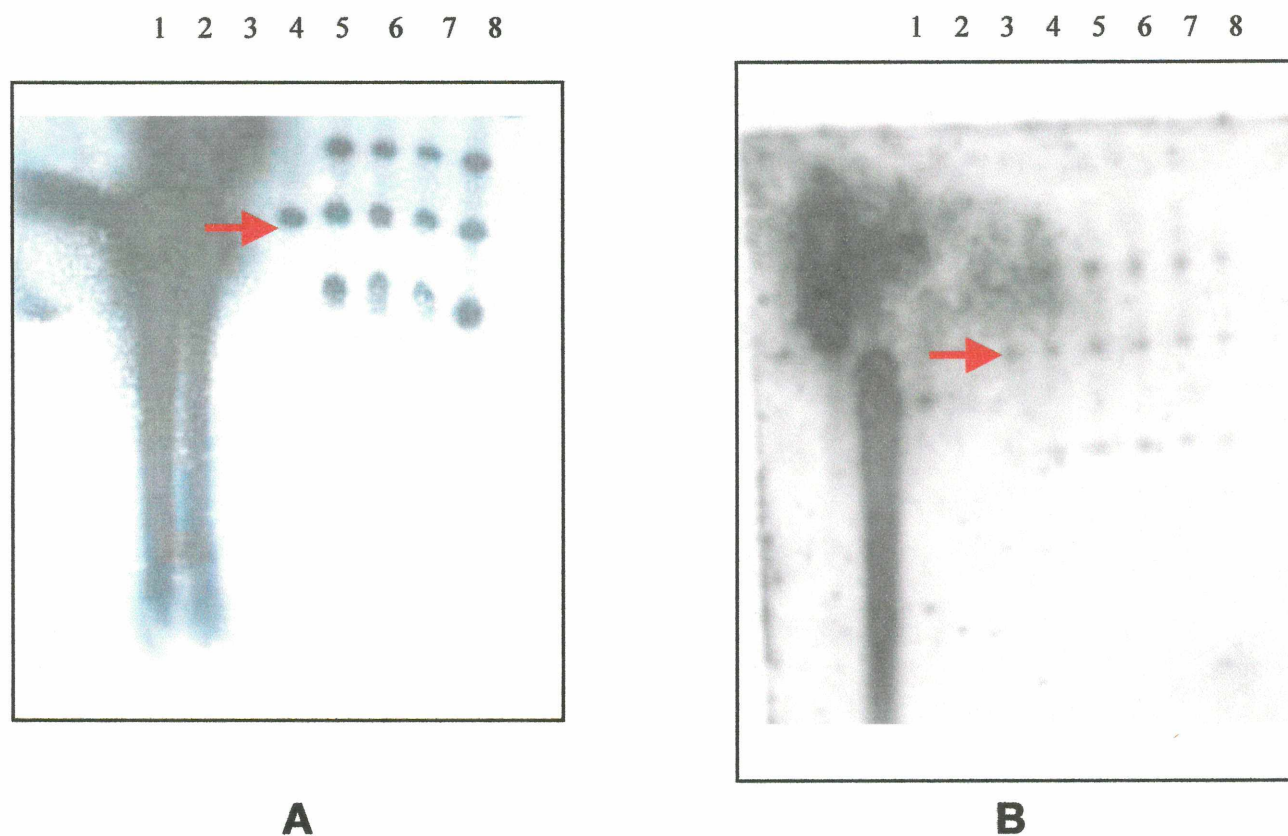


Figura 8. Hibridização dos mutantes cromossômicos. As linhas 5,6,7,8 da figura A indicam, respectivamente, os clones 5A, 5B, 11B e 39 clivados com as enzimas *Bam*HI/*Sal*I. As linhas 4,5,6,7,8 da figura B indicam, respectivamente, os clones 10, 34, 36, 27 e 32, clivados com as enzimas *Bam*HI/*Sal*I. As linhas 4 e 3 das figuras A e B, respectivamente, indicam a estirpe *H. seropedicae* SmRI (controle) clivada com as enzimas *Bam*HI/*Sal*I. A seta vermelha indica a banda correspondente ao fragmento que contém o gene *modE* na estirpe *H. seropedicae* SmRI, que se repete para todos os clones indicados.

3.2. Análise estrutural da região a montante ao gene *modE*

3.2.1. Sequenciamento e análise da região proximal da *orf4* de *H. seropedicae*.

O DNA inserto do plasmídeo pELV22B foi amplificado (2.10) utilizando os *primers* Universal e Reverso, o produto da reação foi purificado e utilizado como molde para a reação de sequenciamento (2.11). Foram realizadas nove reações de sequenciamento, cinco utilizando o *primer* Universal e quatro utilizando o *primer* Reverso. As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa Auto Assembler 1.4 (Perkin-Elmer, Foster, EUA). A seqüência resultante foi alinhada à seqüência da região distal da *orf4* (450 nucleotídeos) já descrita por Voigt (2000). A *orf4* foi, então, estendida em 246 nucleotídeos. A nova seqüência de 696 nucleotídeos se estende até o sítio de restrição para a enzima *EcoRI* na extremidade do inserto contido no plasmídeo pELV22B (Fig.9). Esta seqüência foi submetida à comparação com seqüências de aminoácidos de proteínas do banco de dados através do programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Esta comparação revelou 27% de identidade e 44% de similaridade com a subunidade α da enzima luciferase de *Nostoc sp.* e baixa similaridade com outras proteínas, com funções não relacionadas, de espécies filogeneticamente distantes. A seqüência submetida apresentou homologia com 189 dos 333 aminoácidos da subunidade α da enzima luciferase o que corresponde a sua porção central mais carboxiterminal. Isto sugere que esta seqüência corresponde a aproximadamente 2/3 do gene que codifica para luciferase.

EcoRI

TCCTCAAGT <u>GAATTC</u> GGCGTGGCACGCGGCGGCCCGTTTCCGAGCAATAT	50
CGTCACGCCGGATTGAGCGGTGCCGATCAGGCGCGCGCACGCATGATTGA	100
AGCACTGGACGTCATCCAGCGCGCATGGCAAGGCGTGCCATTCACTACCG	150
AGGGACGATTTTTTCACTACGACAGAGTGCAGTTGCAACCGCAGCCGCTG	200
CAACGTCCCATCCCGGTATGGCTGGCCAGCATGAGCGAAGATTCGCTTGA	250
TCTGGCCGCACGCCAGGATTACGGATTGATGGCCACACCCTCCGCCGATC	300
TTGAGCAGGTGCTCACGCGGGTGGCTGCACAGCGTGCGCAGCGCGGTAC	350
TTCCCGTTTGCCATCGCCCGCTTTTTTCCATTGCGAACCCGAGGCGCACAA	400
GGCGCTTGCCCATGGTCTGGCAGGTGTGCGTGCGTATCCGCGCATGATGC	450
AAGTGCAATTCGCGCCCGGTGGCACCCCGCCCATGTTCCAGGCCGATGCC	500
TCCGATCAAGTCATCCTGGCCAACGCCATCATCGGCGACCCGGCGCAATG	550
CGTGGCACGCATCGGCCAGCTGCAAGAAAACTGGGGCCGCATCGCCTGC	600
TGCTCAAGCCTGCCAGCCACGATCCCCAGCAAGCGCGCGCAGCCCTGAGC	650
TTGCTGGCGGGCGCGCTGGGACTGCGAGCCATCGGCAAGGACATGA	696

PstI

Figura 9. Sequenciamento da região proximal da *orf4* contida no plasmídeo pELV22B (Fig. 2).
O sítio *EcoRI* (GAATTC) e o sítio *PstI* (CTGCAG) apresentam-se sublinhados e a região
seqüenciada está representada em azul.

3.2.2. Análise da *orf4* e da região a montante ao gene *nifA*

Da sequência descrita no item anterior, foram tomados 687 nucleotídeos do inserto do plasmídeo pELV22B, contados a partir do sítio para a enzima *EcoRI*, e 498 nucleotídeos do fragmento *EcoRI/EcoRV* do plasmídeo pELV2B (SOUZA, E.M., comunicação pessoal) também contados a partir do sítio para a enzima *EcoRI*. Esta sequência com um total de 1185 nucleotídeos (Fig. 10) foi submetida ao programa Analyseq (STADEN, 1982). Através do método de preferência de códons constatou-se a presença de uma ORF (região codificadora de proteína) aparentemente completa na fase de leitura 1, acima da linha pontilhada, a qual representa a probabilidade de 50% de ocorrência de uma ORF na sequência, conforme a preferência de códons de *H. seropedicae* (Fig.11). Esta sequência foi submetida à comparação com sequências de aminoácidos de proteínas do banco de dados através do programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997). O resultado desta comparação revelou 34% de identidade e 53% de similaridade com a subunidade α da enzima luciferase de *Nostoc sp.*; 29% de identidade e 43% de similaridade com a luciferase de *Xylella fastidiosa*; 45% de identidade e 55% de similaridade com uma proteína semelhante a LuxA de *Bradyrhizobium japonicum*; 26% de identidade e 49% de similaridade com uma proteína homóloga a LuxA de *Rhizobium sp.* Em seguida esta mesma sequência foi traduzida no programa BioEdit 4.8.8 (HALL, 1999) resultando na sequência de aminoácidos correspondentes (Fig. 12). Desta forma, esta sequência de 1185 nucleotídeos provavelmente corresponde a uma *orf* completa.

Estes resultados indicam que a região localizada a montante ao gene *modE* de *H. seropedicae*, anteriormente referida e descrita por Voigt (2000) como *orf4*, é o gene *luxA*.

ATGAGCTGGTACGCAGCTGGTTCCACTCGCCCCGCCACCGACATGCTGCCG	50
CCGATAGCGGATCTGATCCGGCCATCGGGAAGATCCGAATCATGACCTGC	100
GCCATCCGGCATCGCATCCCCGCATCTGTTTCTTGATGCGGCCGGTCTGA	150
<i>luxA</i> →	
GGCATGTCCAACCTCTTTTTCCCGTGAACCTGCCATGCCGGATTACCCGCA	200
ACGCTACGGCGTCTTCCTCAATGTCGAAAATCCCCATGGCAACGCACGCG	250
ATGCGCTGTTGCAGACCGTCGATCATGCCGTCTGTCAGAGGCCCTGGGC	300
TATCACGATGTCTGGGTCGCCGAGCACCATTACAGCAGCTTCGCCATCGG	350
CAGCGCCTTGATGGTGCTGCTGGCCCAGATCGCCGCACGCACTTCGCGCA	400
TCCGCCTCGGTACGGGCGCTTCGTTGCTGGCGCTCAATGATCCCTTGCGG	450
GTTGCCGAGGACGTGCCACGCTGGACCTGCTCAGCAACGGCCGGATGGA	500
ATTCGGCGTGACGCGCGGCCCGTTCCTCGAGCAATATCGTCACGCCG	550
GATTGAGCGGTGCCGATCAGGCGCGCGCACGCATGATTGAAGCACTGGAC	600
GTCATCCAGCGCGCATGGCAAGGCGTGCCATTAGTACCGAGGGACGATT	650
TTTTCACTACGACAGAGTGCAAGTTGCAACCGCAGCCGCTGCAACGTCCCA	700
TCCCGGTATGGCTGGCCAGCATGAGCGAAGATTGCTTGATCTGGCCGCA	750
CGCCAGGATTACGGATTGATGGCCACACCCTCCGCCGATCTTGAGCAGGT	800
GCTCACGCGGGTGGCTGCACAGCGTGCGCAGCGCGGTCACTTCCCGTTTG	850
CCATCGCCCCGCTTTTTCCATTGCGAACCCGAGGCGCACAAGGCGCTTGCC	900
CATGGTCTGGCAGGTGTGCGTGCGTATCCGCGCATGATGCAAGTGCAATT	950
CGCGCCCGGTGGCACCCCCGCCATGTTCCAGGCCGATGCCTCCGATCAAG	1000
TCATCCTGGCCAACGCCATCATCGGCGACCCGGCGCAATGCGTGGCACGC	1050
ATCGGCCAGCTGCAAGAAAACTGGGGCCGCATCGCCTGCTGCTCAAGCC	1100
TGCCAGCCACGATCCCCAGCAAGCGCGCGCAGCCCTGAGCTTGCTGGCGG	1150
<i>modE</i> →	
GCGCGCTGGGACTGCAGCCATCGGCAAGGACA <u>ATG</u> AGTACCTTGCCTGCCA	1200
CCGATACCACCTTGTTGAGCAGCGAACTGAACTGGTGCATCGCCTGGAC	1250

Figura 10. Sequência da região a montante ao gene *modE* (gene *luxA*). Em vermelho está indicado o provável códon de início de tradução para o gene *luxA*. Em verde está indicado o provável sítio de ligação do ribossomo. O provável códon de término de tradução para o gene *luxA* está indicado em azul. O sítio para a enzima *EcoRI* está indicado em rosa. O códon de início de tradução para o gene *modE* está sublinhado.

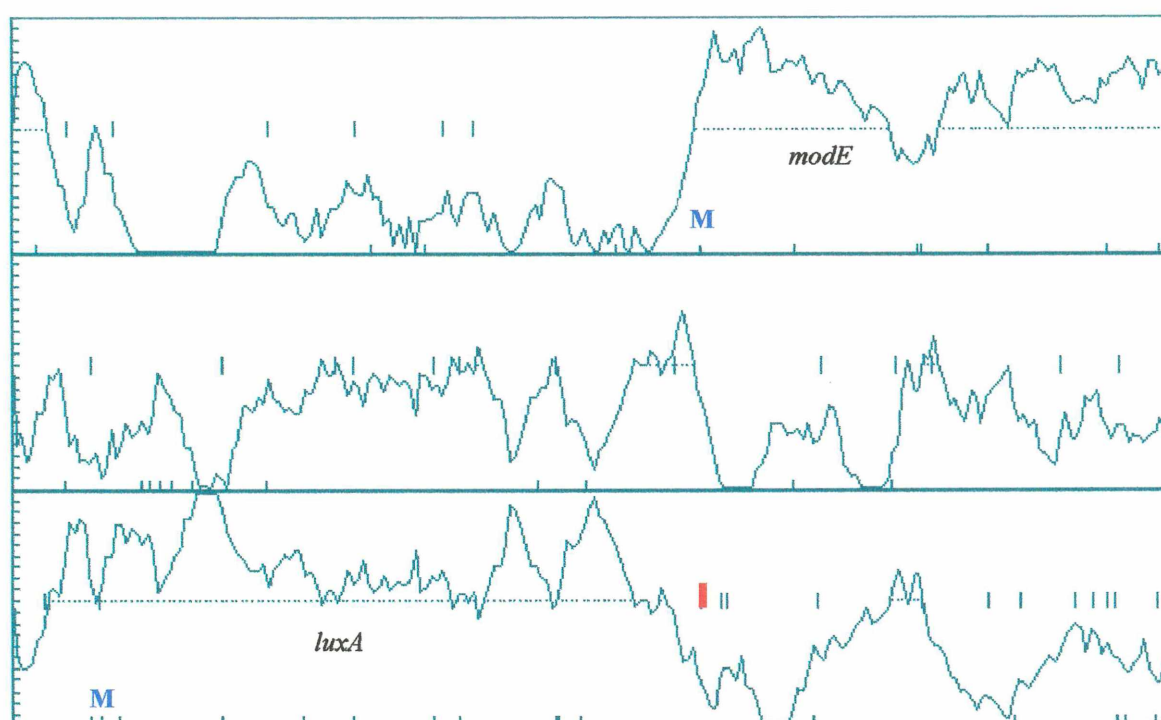


Figura 11. Identificação da provável região codificadora de proteína do gene *luxA*. Cada seção do gráfico representa uma fase de leitura (fases de leitura 1, 2 e 3, de baixo para cima). A provável região correspondente ao *luxA* está representada na fase de leitura 1, acima da linha pontilhada. O primeiro aminoácido (metionina), que corresponde ao provável códon de início de tradução está indicado pela letra M, em azul. O provável códon de término de tradução está indicado por um traço vermelho.

1	ATG	AGC	TGG	TAC	GCA	GCT	GGT	TCC	ACT	CGC	CCG	CCA	CCG	ACA	TGC	45
1	M	S	W	Y	A	A	G	S	T	R	P	P	P	T	C	15
46	TGC	CGC	CGA	TAG	CGG	ATC	TGA	TCC	GGC	CAT	CGG	GAA	GAT	CCG	AAT	90
16	C	R	R	*	R	I	*	S	G	H	R	E	D	P	N	30
91	CAT	GAC	CTG	CGC	CAT	CCG	GCA	TCG	CAT	CCC	CGC	ATC	TGT	TTC	TTG	135
31	H	D	L	R	H	P	A	S	H	P	R	I	C	F	L	45
<i>luxA</i> →																
136	ATG	CGG	CCG	GTC	TGA	GCG	ATG	TCC	AAC	TCT	TTT	TCC	CGT	GAA	CCT	180
46	M	R	P	V	*	A	M	S	N	S	F	S	R	E	P	60
181	GCC	ATG	CCG	GAT	TAC	CCG	CAA	CGC	TAC	GGC	GTC	TTC	CTC	AAT	GTC	225
61	A	M	P	D	Y	P	Q	R	Y	G	V	F	L	N	V	75
226	GAA	AAT	CCC	CAT	GGC	AAC	GCA	CGC	GAT	GCG	CTG	TTG	CAG	ACC	GTC	270
76	E	N	P	H	G	N	A	R	D	A	L	L	Q	T	V	90
271	GAT	CAT	GCC	GTC	GTG	GCA	GAG	GCC	CTG	GGC	TAT	CAC	GAT	GTC	TGG	315
91	D	H	A	V	V	A	E	A	L	G	Y	H	D	V	W	105
316	GTC	GCC	GAG	CAC	CAT	TAC	AGC	AGC	TTC	GCC	ATC	GGC	AGC	GCC	TTG	360
106	V	A	E	H	H	Y	S	S	F	A	I	G	S	A	L	120
361	ATG	GTG	CTG	CTG	GCC	CAG	ATC	GCC	GCA	CGC	ACT	TCG	CGC	ATC	CGC	405
121	M	V	L	L	A	Q	I	A	A	R	T	S	R	I	R	135
406	CTC	GGT	ACG	GGC	GCT	TCG	TTG	CTG	GCG	CTC	AAT	GAT	CCC	TTG	CGG	450
136	L	G	T	G	A	S	L	L	A	L	N	D	P	L	R	150
451	GTT	GCC	GAG	GAC	GTC	GCC	ACG	CTG	GAC	CTG	CTC	AGC	AAC	GGC	CGG	495
151	V	A	E	D	V	A	T	L	D	L	L	S	N	G	R	165
496	ATG	GAA	TTC	GGC	GTG	GCA	CGC	GGC	GGC	CCG	TTT	CCC	GAG	CAA	TAT	540
166	M	E	F	G	V	A	R	G	G	P	F	P	E	Q	Y	180
541	CGT	CAC	GCC	GGA	TTG	AGC	GGT	GCC	GAT	CAG	GCG	CGC	GCA	CGC	ATG	585
181	R	H	A	G	L	S	G	A	D	Q	A	R	A	R	M	195
586	ATT	GAA	GCA	CTG	GAC	GTC	ATC	CAG	CGC	GCA	TGG	CAA	GGC	GTG	CCA	630
196	I	E	A	L	D	V	I	Q	R	A	W	Q	G	V	P	210
631	TTC	AGT	ACC	GAG	GGA	CGA	TTT	TTT	CAC	TAC	GAC	AGA	GTG	CAG	TTG	675
211	F	S	T	E	G	R	F	F	H	Y	D	R	V	Q	L	225
676	CAA	CCG	CAG	CCG	CTG	CAA	CGT	CCC	ATC	CCG	GTA	TGG	CTG	GCC	AGC	720
226	Q	P	Q	P	L	Q	R	P	I	P	V	W	L	A	S	240
721	ATG	AGC	GAA	GAT	TCG	CTT	GAT	CTG	GCC	GCA	CGC	CAG	GAT	TAC	GGA	765
241	M	S	E	D	S	L	D	L	A	A	R	Q	D	Y	G	255
766	TTG	ATG	GCC	ACA	CCC	TCC	GCC	GAT	CTT	GAG	CAG	GTG	CTC	ACG	CGG	810
256	L	M	A	T	P	S	A	D	L	E	Q	V	L	T	R	270
811	GTG	GCT	GCA	CAG	CGT	GCG	CAG	CGC	GGT	CAC	TTC	CCG	TTT	GCC	ATC	855
271	V	A	A	Q	R	A	Q	R	G	H	F	P	F	A	I	285

856	GCC	CGC	TTT	TTC	CAT	TGC	GAA	CCC	GAG	GCG	CAC	AAG	GCG	CTT	GCC	900
286	A	R	F	F	H	C	E	P	E	A	H	K	A	L	A	300
901	CAT	GGT	CTG	GCA	GGT	GTG	CGT	GCG	TAT	CCG	CGC	ATG	ATG	CAA	GTG	945
301	H	G	L	A	G	V	R	A	Y	P	R	M	M	Q	V	315
946	CAA	TTC	GCG	CCC	GGT	GGC	ACC	CCG	CCC	ATG	TTC	CAG	GCC	GAT	GCC	990
316	Q	F	A	P	G	G	T	P	P	M	F	Q	A	D	A	330
991	TCC	GAT	CAA	GTC	ATC	CTG	GCC	AAC	GCC	ATC	ATC	GGC	GAC	CCG	GCG	1035
331	S	D	Q	V	I	L	A	N	A	I	I	G	D	P	A	345
1036	CAA	TGC	GTG	GCA	CGC	ATC	GGC	CAG	CTG	CAA	GAA	AAA	CTG	GGG	CCG	1080
346	Q	C	V	A	R	I	G	Q	L	Q	E	K	L	G	P	360
1081	CAT	CGC	CTG	CTG	CTC	AAG	CCT	GCC	AGC	CAC	GAT	CCC	CAG	CAA	GCG	1125
361	H	R	L	L	L	K	P	A	S	H	D	P	Q	Q	A	375
1126	CGC	GCA	GCC	CTG	AGC	TTG	CTG	GCG	GGC	GCG	CTG	GGA	CTG	CAG	CCA	1170
376	R	A	A	L	S	L	L	A	G	A	L	G	L	Q	P	390
1171	TCG	GCA	AGG	ACA	TGA											1185
391	S	A	R	T	*											

Figura 12. Sequência de nucleotídeos do gene *luxA* e sequência de aminoácidos deduzida da proteína LuxA de *Herbaspirillum seropedicae*. A primeira metionina está indicada em vermelho, o provável códon de início de tradução está indicado em azul e o provável códon de término de tradução está indicado em rosa. O sítio para ligação do ribossomo está indicado em verde.

3.2.3. Gene *luxA*

O gene *luxA* de *H. seropedicae* é composto por 1032 nucleotídeos (Fig. 10). Foi localizado a montante do gene *modE* e a aproximadamente 1,2 kb do gene *nifA*. Ele é transcrito na direção oposta do gene *nifA* e na mesma direção do gene *modE*. O seu provável códon de término de tradução se sobrepõe ao códon de início de tradução do gene *modE*.

Os genes *lux* estão envolvidos com as reações de emissão de luz em bactérias luminescentes (MYIAMOTO *et al.*, 1988; SZITTNER *et al.*, 1990; MEIGHEN, 1993; VISICK *et al.*, 2000). Em várias espécies dos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Xenorhabdus* os genes *lux* foram clonados e sequenciados. Na maioria destes organismos os genes *luxCDE* flanqueiam os genes *luxAB* (SZITTNER *et al.*, 1990; MEIGHEN, 1993) sendo transcritos na ordem *luxCDABE*. Em *Photobacterium phosphoreum* o gene *luxF* localiza-se entre os genes *luxB* e *luxE*, sendo transcritos na ordem *luxCDABFE* (MANCINI *et al.*, 1988). Neste trabalho o gene *luxA* de *H. seropedicae* foi identificado a montante dos genes *modE* e *nifA* (Fig. 13). Entre os genes *luxA* e *nifA* existe uma região intergênica de 1173 nucleotídeos ainda não caracterizada. Desta forma o gene *luxA* em *H. seropedicae* está disposto de forma distinta da descrita para outros organismos (Fig. 14).

O gene *luxA* das bactérias luminescentes citadas codifica para a subunidade α da enzima luciferase. Foi sugerido que a luciferase de bactérias luminescentes, alternativamente, poderia catalisar a transferência de elétrons ao oxigênio, servindo como uma via alternativa de transporte de elétrons em baixa pressão de oxigênio (MEIGHEN, 1993). Da mesma forma pode ocorrer para a proteína LuxA de *H. seropedicae* uma vez que este microrganismo não é luminescente. A proteína LuxA de *H. seropedicae* possui 343 aminoácidos e apresenta massa molecular de aproximadamente 42888 Da, calculada pelo programa BioEdit 4.8.8 (HALL, 1999). O ponto isoelétrico desta proteína foi calculado pelo programa "EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service" do banco de dados EMBL e foi estimado em aproximadamente pH 6,75.

A sequência de aminoácidos deduzida da proteína LuxA de *H. seropedicae* foi comparada a de outras espécies pelo programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997), através do que constatou-se homologia com 308 dos 333 aminoácidos da

subunidade α da luciferase de *Nostoc* sp.; com 240 dos 321 aminoácidos da luciferase de *X. fastidiosa*; com 84 dos 458 aminoácidos de uma proteína semelhante a LuxA de *B. japonicum*; com 185 dos 279 aminoácidos de uma proteína homóloga a LuxA de *Rhizobium* sp. e com 128 dos 321 aminoácidos da luciferase de *V. harveyi*.

A proteína LuxA de *H. seropedicae* foi comparada e alinhada com as mesmas proteínas das espécies citadas acima através do programa Clustal W (HIGGINS *et al.*, 1994) que revelou algumas regiões conservadas entre estas proteínas (Fig. 15). A sequência de aminoácidos da proteína LuxA de *H. seropedicae* também foi submetida ao programa SMART (SCHULTZ *et al.*, 1998) para identificação de domínios característicos, o qual indicou a ocorrência do domínio Pfam : bac_luciferase entre os aminoácidos 16 e 312 (Fig. 15). Este programa também revelou a ausência de peptídeo sinal e de segmentos transmembrana.

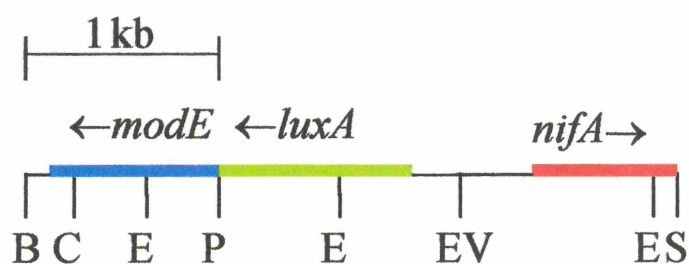


Figura 13. Organização estrutural dos genes *modE*, *luxA* e *nifA* de *Herbaspirillum seropedicae*.

O plasmídeo pTZ19R é o vetor. A região proximal do gene *nifA* está representada por um traço vermelho. O gene *modE* está representado em azul e o gene *luxA* está representada em verde. As setas indicam a direção de transcrição dos genes *nifA*, *modE* e *luxA*. São indicados os sítios *Bam*HI (B), *Cl*al (C), *Eco*RI (E), *Pst*I (P), *Eco*RV (EV) e *Sal*I (S).

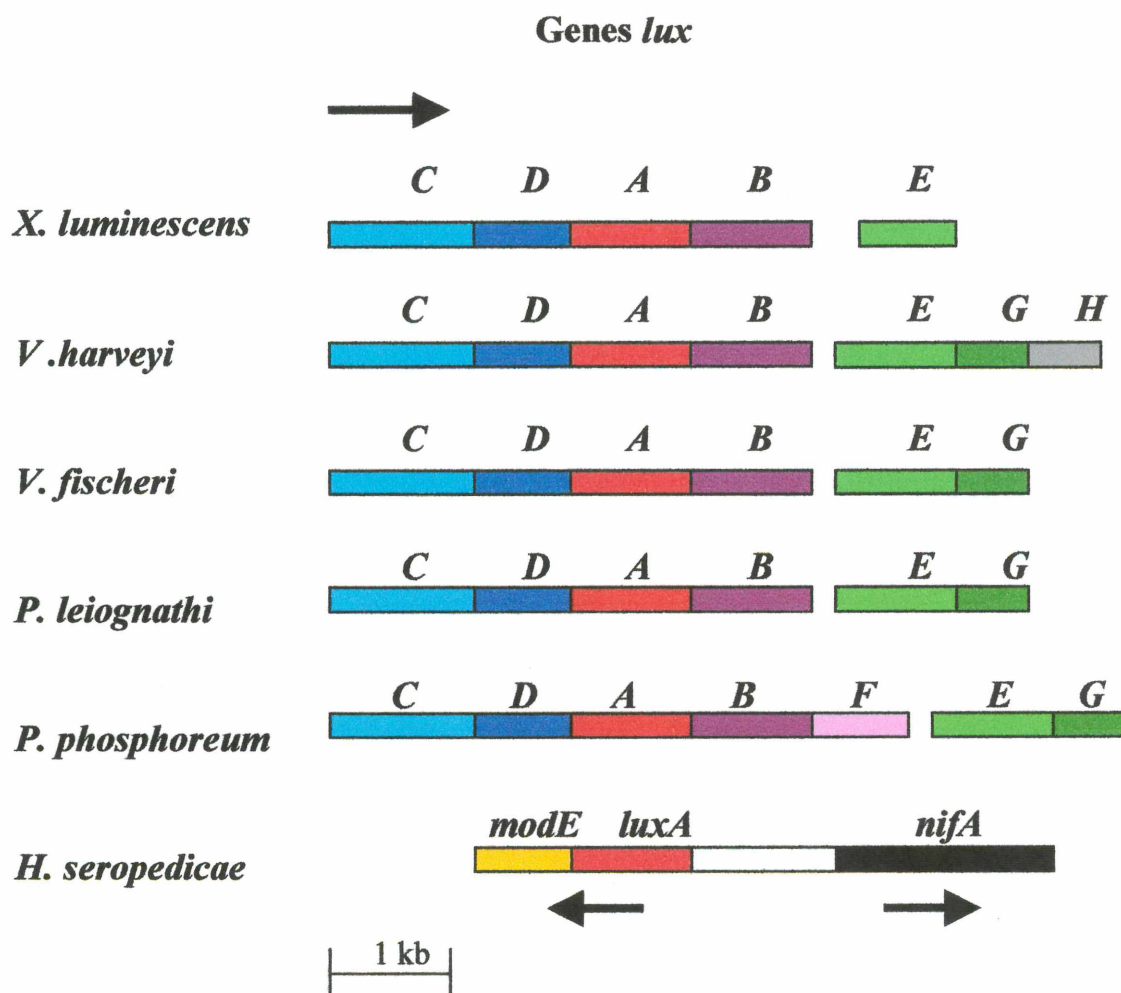


Figura 14. Organização dos genes *lux* no genoma de diferentes microrganismos. Em azul claro está indicado o gene *luxC*, em azul escuro o gene *luxD*, em vermelho o gene *luxA*, em vinho o gene *luxB*, em verde claro o gene *luxE*, em verde escuro o gene *luxG*, em rosa o gene *luxF* e em cinza o gene *luxH*. Para a espécie *H. seropedicae*, em amarelo está indicado o gene *modE*, em vermelho o gene *luxA* e em preto o gene *nifA*. Uma região intergênica está indicada em branco. As setas indicam o sentido de transcrição destes genes. Adaptado de MEIGHEN (1993).

NOST HLAGVTSITIKLGTAAVLLPFHNPIRVAEDIATLDNLGNRLFGVAKGGPFPQHNNKFAT119
BRAD AASQRTQKIRLGHGILQLTNNHPARVAERVAVLDDLNSGRCEFSGMGESASITELEP-FGR179
XYLE WVAARSQNLRIGVLGWVLPWQPWRFLKAVAVLDQLSQGRVEIGVARSSVDAAAAGVIA129
RHIZ HCAGLTSTIRLGTAVCVLPPLYQPQRLLAEIGFVDVVANGRLGLGVSGYQQFEFDR-FGV120
PHOT NLLGRITTKINVGT-MIVLPTAHAPARQMEDLLLLDQMSKGRFNFGVVVRG--YHKDFRVFGV115
HERB QIAARTSRIRLGTGASLLALNDPLRVAEDVATLDLLSNGRMFFGVARGGPFPPEQYRHAGL134

: : : * * * * : : * : : ** : * :

NOST P-MGESRAMMLEALALIQKLLYETDVSFNGQYYQCDRLTVYPKPLQQEIP-VYLATGDDV177
 BRAD D-METKKEVFEEAVAAIFFPMFRDAGSEHHGKYFDIPLRNVVPKPVQKHPPLWMACSQLP238
 XYLE E--VDIVPMYREALDILEQAWLSPCLSYRGYWSFEQLGMVPRPLQYPSPIIATVRSTD187
 RHIZ N-IDEAPAIFFSECLDILLKGLKQKIFTHSGRYMQIPPTAISVRTLQKPTPIIWIATASSK179
 PHOT T-MEDSRAITEDFHTMIMDGTKTG-LHTDGKNIEFPDENVYPEAYLEKIP--TCMTAESAL171
 HERB **SGADQARARMIEALDVIQRAWQGVFPFSTEGRFFHYDRVQLQPOPLQRPIP-WLASMS**EDS193

. . * . . . * .

NOST GIEFAAKHS FALMGGPPFALERLKKTIVETIR-----ALNSSGGEK FVLARFF YVGK228
BRAD TIERAGRHG FGALGFQFVSADAAHAWHAYYNAMTKRLHTLADYEINPNMAIVSFEMCAK298
XYLE AAAEAAKRGHRLCTG-FLHTDAIVRLFVYR-----EAAGHMHTAERLAIRRCIFVAK239
RHIZ TMARAYREGHNLFVTALHDG-----LETLGLLRGLIKTA213
PHOT TTTWLAERGLPMVLSWIIITSEKKAQMELYNVRDSGYSEEIKNVDHSMTLICSVDEGD231
HERB LDLAARQDYGLMATPSADLEQVLTRVAAQR-----AQR--GHFPFIAARFFHCEP241

NOST TYDEAVTEALP-----FIRYFSQKMTANSSQVMQNGSSGHKQFDRTNICFDEEDYLIEN281
BRAD TDEEARAPPTAPPSS--SSALRFYGAAQNRQRPAPYTVNMWDEYNKWKRDNPEAQEAALRG357
XYLE TEAQARAHARA-----AQAQMP-----SMLDDD262
RHIZ AGSEGKE-----VRD223
PHOT KKAEDVREFLGNWYDSYVNATNIFSESQTRGYDYHKQKDFVLQGHNTNTRRRVDYSDNL291
HERB EAHKAHAGLA-----GVRAYPRMMQV--QFAPGGTTPPMFQADAS-----DQVILAN286
:

continua...

```

NOST SIIGDVATCRDKIK-KFQDELDLGTALALKPSS-FALQKNQESLQRYNQEVQNYV-----333
BRAD GLIGSPETIRKKLR-RFQSSHIDQVILLNQAGKNSHEHICESLEELFGREVMPEFQNDPAQ416
XYLE IIAGTPAQVTEQILLQLGRTGAANIVGFFTGHRCDPDLVRTSCDLFGEYVIPALQSASI-321
RHIZ SKVSLLRCCYASDDGAEINSYIDNARFQRRLEALQORRQQSKDGYMLEEMPTHQD----279
PHOT NPVGTPEKCIQIQR-DIDATGITNITLGFANGSEEEIIASMKRFMQVAPFLKDPK----346
HERB AIIGDPAQCVARIG-QLQEKLGPHRLLLLPAS-HDPQQARAALSLLAGALGLQPSART--339

```

```

NOST -----
BRAD AAWKRSVMSGEIKLEEIDTQAF'TDRYGKLAVNVAPARAAAAG 458
XYLE -----
RHIZ -----
PHOT -----
HERB -----

```

Figura 15. Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas LuxA de *H. seropedicae* (Herb), *P. phosphoreum* (Phot), *B. japonicum* (Brad), *X. fastidiosa* (Xyle), *Rhizobium* sp. (Rhiz) e *Nostoc* sp. (Nost). Em azul estão indicados os resíduos de aminoácidos com 100% de identidade. Em verde estão indicados os resíduos com alta similaridade. Em rosa estão indicados os resíduos com baixa similaridade. Em vermelho está indicado a provável metionina que inicia a proteína LuxA em *H. seropedicae*. O domínio Pfam: bac_luciferase da proteína LuxA de *H. seropedicae* está sublinhado e em negrito.

3.3. Análise de uma possível região promotora para os genes *luxA* e/ou *modE* de *H. seropedicae*.

De acordo com as análises descritas nos itens anteriores foi observado que o provável códon de término de tradução para o gene *luxA* está sobreposto ao códon de início de tradução para o gene *modE* o que pode indicar, como já sugerido por Voigt (2000), que estes dois genes façam parte de um operon.

Desta forma, para analisar a presença de uma possível região promotora para os genes *luxA* e/ou *modE*, foram realizadas subclonagens (2.9) no vetor de fusão-*lacZ* sem promotor, pMP220 (Fig.16). Foram clonados o fragmento *EcoRI/PstI* do plasmídeo pELV22B (Fig.2), que contém 585 nucleotídeos da região a montante ao gene *modE* de *H. seropedicae*, e o fragmento *EcoRV/PstI* do plasmídeo pELV2B (Fig.2), que contém 1266 nucleotídeos da região a montante ao gene *modE*. Este último fragmento contém 978 dos 1032 nucleotídeos componentes do gene *luxA* mais 258 nucleotídeos acima do códon de início de tradução deste gene. Os fragmentos foram clonados e ensaiados para a atividade de β -galactosidase cujos resultados estão descritos na sequência.

3.3.1. Subclonagem do fragmento *EcoRI/PstI* de pELV22B.

A mistura de ligação contendo vetor (pMP220) e inserto preparados apropriadamente (2.7 e 2.8) foi eletroporada (2.6) em células da estirpe *E. coli* DH5 α . Foram obtidos dois clones dos quais foram extraídos os plasmídeos pANG2 e pANG3, confirmados por análise de restrição e eletroforese comparados com os controles pMP220 e pELV22B (Fig.17). As linhas 4 e 5 mostram o perfil eletroforético dos plasmídeos pANG2 e pANG3, respectivamente, clivados com as enzimas *EcoRI* e *PstI*, onde observa-se uma banda de aproximadamente 0,6 kb correspondente ao inserto que contém a *orf4* e outra de aproximadamente 10 kb, correspondente ao vetor pMP220. Na linha 3 que mostra o perfil eletroforético do plasmídeo controle (pELV22B) clivado com as mesmas enzimas observa-se uma banda de 0,6 kb e outra de aproximadamente 2,9 kb correspondentes ao inserto e ao vetor pTZ19R,

respectivamente. Estes resultados confirmam a clonagem do fragmento no vetor pMP220.

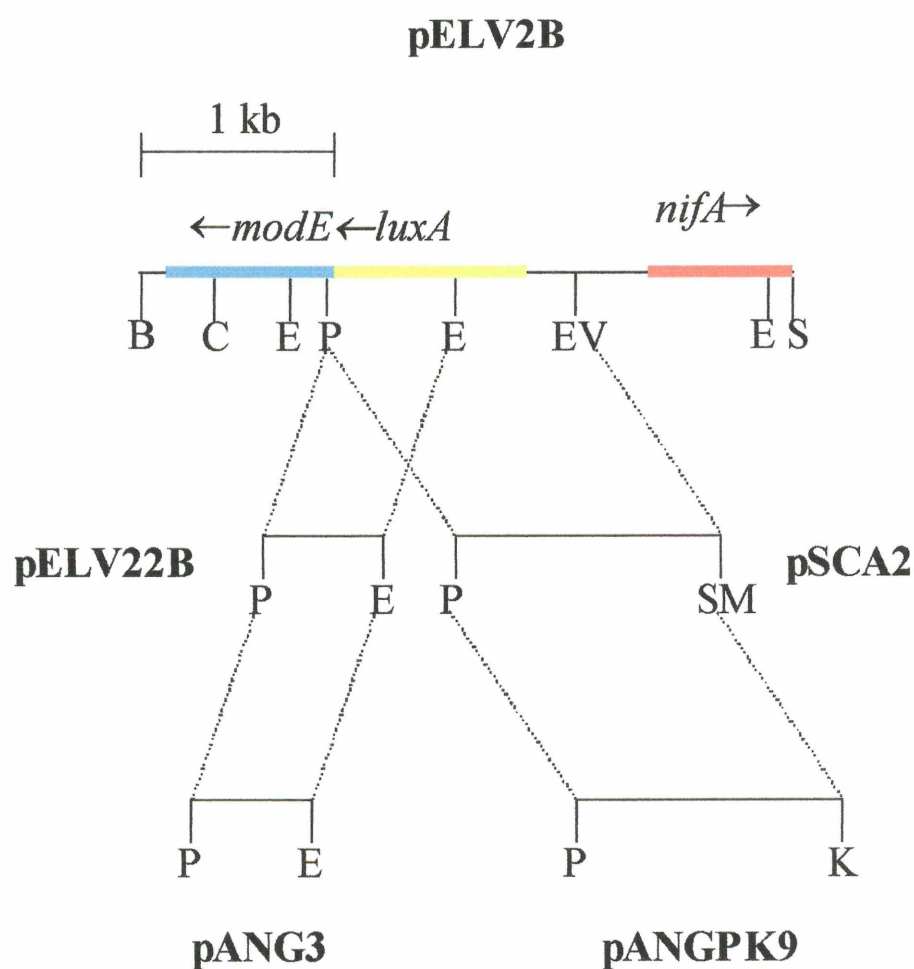


Figura 16. Esquema das subclonagens dos fragmentos derivados do plasmídeo pELV2B. O vetor do plasmídeo pSCA2 é pTZ19R e o vetor dos plasmídeos pANG3 e pANGPK 9 é pMP220. Em vermelho está indicado a região proximal do gene *nifA*. O gene *modE* está representado em azul e o gene *luxA* em verde. As setas indicam a direção de transcrição dos genes indicados. Estão indicados os sítios para as enzimas: *Bam*HI (B), *Cl*al (C), *Eco*RI (E), *Pst*II (P) *Eco*RV (EV), *Sal*I (S), *Sma*I (SM) e *Kpn*I (K).

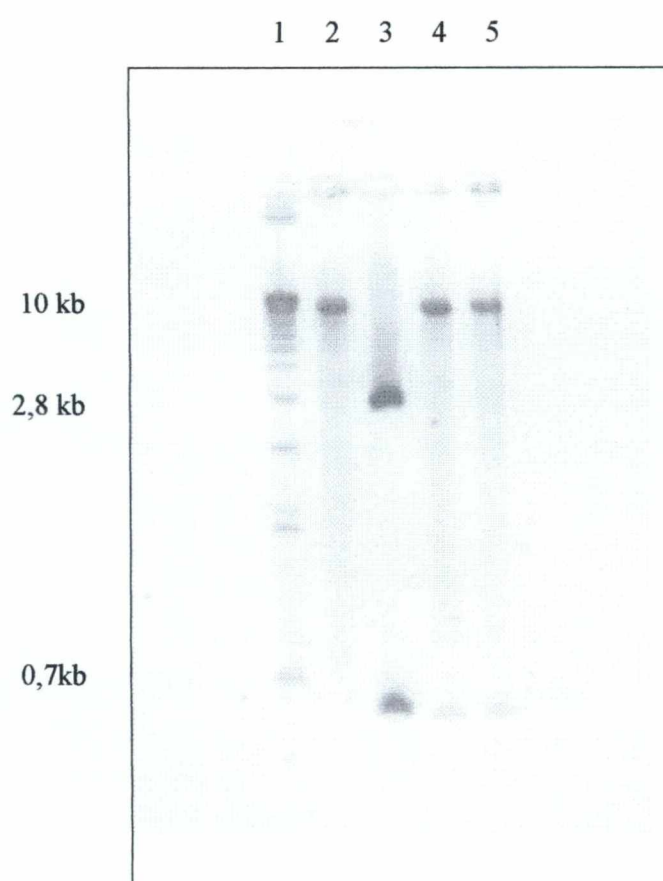


Figura 17. Perfil eletroforético dos plasmídeos pANG2 e pANG3. A linha 1 mostram o marcador de peso molecular. As linhas 2 e 3 mostram o vetor pMP220 e o plasmídeo pELV22B (controle), respectivamente, ambos clivados com as enzimas *EcoRI* e *PstI*. As linhas 4 e 5 mostram o perfil eletroforético dos plasmídeos pANG2 e pANG3, respectivamente, clivados com as enzimas *EcoRI* e *PstI*.

3.3.2. Subclonagem do fragmento *EcoRV/PstI* de pELV2B.

Como não existe um sítio de reconhecimento para a enzima *EcoRV* no vetor pMP220 (anexo I), foi necessário realizar, primeiramente, a subclonagem do fragmento *EcoRV/PstI* no vetor pTZ19R (anexo II). Este vetor possui um sítio para a enzima de restrição *SmaI* que produz uma extremidade compatível com aquela produzida pela enzima *EcoRV*. Sendo assim, o plasmídeo pELV2B foi digerido com as enzimas *EcoRV/PstI/DraI* produzindo um fragmento *EcoRV/PstI* de aproximadamente 1,3 kb que foi ligado ao vetor previamente digerido com as enzimas de restrição *SmaI/PstI* (2.7 e 2.8). A enzima *DraI* foi utilizada para a digestão do fragmento correspondente ao vetor do plasmídeo pELV2B a fim de impedir que este se ligasse ao vetor digerido e desta forma surgissem células com o vetor sem inserto.

A mistura de ligação foi eletroporada (2.6) em células da estirpe *E. coli* 71.18. Foi selecionado um clone, do qual foi purificado o plasmídeo pSCA2 que foi confirmado por análise de restrição e eletroforese comparado com o controle pTZ19R e pELV2B (Fig. 18). As linhas 2 e 3 mostram o vetor pTZ19R e o plasmídeo pSCA2, respectivamente, clivados com a enzima *PstI*. Observa-se na linha 3 uma banda de aproximadamente 4,2 kb indicando a presença do inserto ligado ao vetor. As linhas 4 e 5 mostram o vetor e o plasmídeo pSCA2, respectivamente, clivados com a enzima *EcoRI*. Esta enzima foi utilizada porque existe um sítio para ela dentro do inserto. Observa-se na linha 5 uma banda numa posição acima daquela encontrada na linha 4. Nas linhas 6 e 7 que mostram o plasmídeo pSCA2 clivado com as enzimas *KpnI/PstI* e *SacI/PstI*, respectivamente, observa-se uma banda de cerca de 1,3 kb correspondente ao inserto e outra de cerca de 2,9 kb correspondente ao vetor, confirmando a ligação do inserto. Não foi possível a utilização das enzimas *EcoRV* e *SmaI* pois os seus sítios foram perdidos durante a clonagem, assim foram utilizadas as enzimas *KpnI* e *SacI* cujos sítios localizam-se na região de policlonagem do vetor.

Para a subclonagem do fragmento citado no vetor pMP220, o plasmídeo pSCA2 foi submetido a digestão com as endonucleases de restrição *KpnI*, *PstI* e *DraI* (2.7) liberando o mesmo fragmento de aproximadamente 1,3 kb contendo a região descrita no item 3.3. Este inserto foi ligado no vetor (2.8) e a mistura de

ligação foi eletroporada em células da estirpe *E. coli* DH10B (2.6). Foram selecionados dois clones dos quais foram purificados os plasmídeos pANGPK9 e pANGPK10, confirmados por análise de restrição e eletroforese comparados ao controle pMP220 (Fig. 19). Observa-se, no perfil dos dois plasmídeos, uma banda de aproximadamente 10,5 kb, correspondente ao vetor e uma banda de cerca de 1,3 kb correspondente ao inserto.

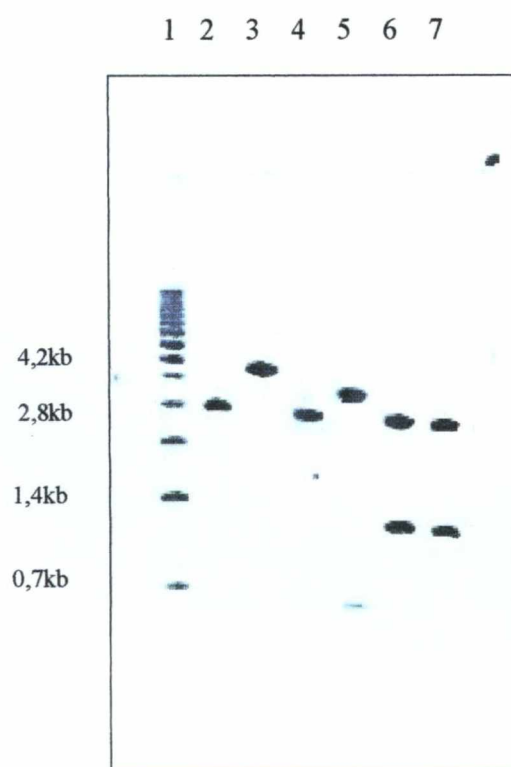


Figura 18. Perfil eletroforético do plasmídeo pSCA2. A linha 1 mostra o marcador de peso molecular. As linhas 2 e 3 mostram, respectivamente, o vetor pTZ19R e o plasmídeo pSCA2 clivados com a enzima *Pst*I. A linha 4 mostra o vetor pTZ19R clivado com a enzima *Eco*RI. As linhas 5, 6 e 7 mostram o plasmídeo pSCA2 clivado com as enzimas *Eco*RI, *Kpn*I/*Pst*I e *Sac*I/*Pst*I, respectivamente.

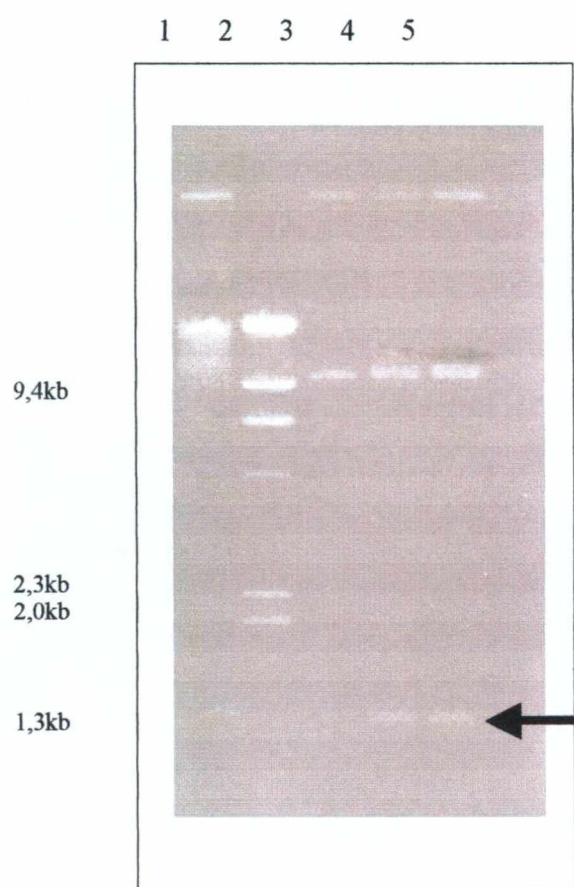


Figura 19. Perfil eletroforético dos plasmídeos pANGPK9 e pANGPK10. As linhas 1 e 2 mostram marcadores de peso molecular. A linha 3 mostra o plasmídeo pMP220 (controle) clivado com as enzimas *Pst*I e *Kpn*I. As linhas 4 e 5 mostram o perfil eletroforético dos plasmídeos pANGPK9 e pANGPK10, respectivamente, também clivados com as enzimas *Pst*I e *Kpn*I. A seta indica os fragmentos clonados.

3.3.3. Ensaios da atividade de β -galactosidase

Células das estirpes *E. coli* DH5 α (pANG3), *E. coli* DH10B (pANGPK9) e *E. coli* DH10B (pANGPK10) foram cultivadas em meios apropriados e delas foram purificados os respectivos plasmídeos (2.3.1). Estes plasmídeos, assim como o seu vetor (pMP220), foram eletroporados (2.6) em células da estirpe *H. seropedicae* SmRI e a presença deles foi confirmada pela sua purificação, seguida de eletroforese em gel de agarose (dados não mostrados).

Células das estirpes *H. seropedicae* SmRI (pANG3), *H. seropedicae* SmRI (pANGPK9), *H. seropedicae* SmRI (pANGPK10) e *H. seropedicae* SmRI (pMP220) foram cultivadas em meio NFbHP com concentrações variadas de molibdato de sódio em condições de baixa amônia como descrito (2.2-g) e ensaiadas para atividade de β -galactosidase (2.16).

Foi verificada uma atividade basal de β -galactosidase para a estirpe *H. seropedicae* SmRI (pMP220) que variou entre 2 e 41 nmol de o- nitrofenol.min⁻¹.mg prot⁻¹. As estirpes *H. seropedicae* SmRI (pANG3), *H. seropedicae* SmRI (pANGPK9), *H. seropedicae* SmRI (pANGPK10) apresentaram atividade específica negativa de β -galactosidase em todas as concentrações de molibdato de sódio utilizadas, que pode ser interpretada como ausência de atividade. Ensaios com a estirpe *H. seropedicae* SmRI utilizada como controle mostraram resultados semelhantes (tabela 3). Sendo assim, as estirpes possuindo os plasmídeos com as fusões descritas apresentaram atividade menor que do próprio vetor onde elas foram construídas, indicando uma inibição da atividade basal.

Os resultados descritos indicam a ausência de promotor nos fragmentos analisados, correspondentes ao gene *luxA* e a região a montante a este gene. Outras análises poderão, ainda, ser realizadas com a região entre os genes *luxA* e *nifA* para investigar a possibilidade dos genes *luxA* e *modE* fazerem parte de um operon.

Tabela 3: Atividade de β -galactosidase

	nmol de <i>o</i> -nitrofenol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹			
molibdato de sódio (mg/L)	0	1,0	2,0	3,5
<i>H. seropedicae</i> SmRI	0	0	0	0
<i>H. seropedicae</i> SmRI (pMP220)	41	2	11	19
<i>H. seropedicae</i> SmRI (pANG3)	0	0	0	0
<i>H. seropedicae</i> SmRI (pANGPK9)	0	0	0	0
<i>H. seropedicae</i> SmRI (pANGPK10)	0	0	0	0

4. CONCLUSÕES

- 1- Mutantes cromossômicos *modE::Tn5-B20* de *Herbaspirillum seropedicae* foram obtidos por simples recombinação.
- 2- Uma ORF anteriormente designada *orf4* foi identificada como o gene *luxA* de *Herbaspirillum seropedicae*. Este gene codifica para a subunidade α da enzima luciferase.
- 3- Os genes *mod* e *lux* de *H. seropedicae* estão organizados de forma diferente da descrita para outras espécies.
- 4- Análises de fusões transcricionais com o gene *lacZ* sugerem a ausência de promotor na região analisada a montante do gene *modE* de *H. seropedicae*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ANDREWS, S.C.; SHIPLEY, D.; KEEN, J.N.; FINDLAY, J.B.C.; HARRISON, P.M.; GUEST, J.R. The haemoglobin-like protein (HMP) of *Escherichia coli* has ferrisiderophore reductase activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin NADP⁺ reductases. **FEBS**, v.302, p.247-252, 1992.
- ANDERSON, L.A.; McNAIRN, E.; LEUBKE, T.; PAU, R.N.; BOXER, D.H. ModE-dependent molybdate regulation of the molybdenum cofactor operon *moa* in *E.coli*. **J. Bacteriol.** v.182, n.24, p.7035-43, 2000.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Short protocols in Molecular Biology**. 4 ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1999.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov.; a root associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem.**, Exeter, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.
- BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Evidence for two possible *glnB* – type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, n.14, p.4623-4626, 1997.

BETHESDA RESEARCH TECHNOLOGIES, INC. **Cell-Porator Eletroporation System**. Gaithersburg, 1987. 27p.

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

CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Chromosomal integration of *Klebsiella* nitrogen fixation genes in *E. coli*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 80, p.227-239, 1974.

CHUNG, C.T.; NIEMELA, S.L.; MILLER, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 86, n.7, p.2172-2175, 1989.

CLARKE, L. & CARBON, J. A colony bank containing synthetic ColE₁ hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. **Cell**, v.9, p.91, 1976.

COHN, D.H.; MILEHAM, A.J.; SIMON, M.I.; NEALSON, K.H. Nucleotide sequence of the *luxA* gene of *Vibrio harveyi* and the complete amino acid sequence of the α subunit of bacterial luciferase. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n.10, p. 6139-6146, 1985.

CZYZ, A.; WROBEL, B.; WEGRZYN, G. *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair. **Microbiology**, v. 146, p.283-288, 2000.

DAVIS, R.W.; Botstein, D.; Roth, J.R. Phage purification. In: **Advances Bacterial Genetics**. 1. ed. New York: Cold Spring Harbour Lab., p.70-73, 1980.

de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids- a review. **Gene**, v.27, p.131-49, 1984.

- DEAN, D.R.; BOLIN, J.T.; ZUENG, L. Nitrogenase metallclusters structures organization, and synthesis. **J.Bacteriol.** v.175, p.6737-6744, 1993.
- DIANESE, J.C.; DÖBEREINER, J.; DOS SANTOS, L.T. Membrane protein patterns of three *Azospirillum* species and *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, v.61 (2), p.3168-75, 1989.
- DIEFFENBACH, C.W.; DVEKSLER, G.S. **PCR primer: a laboratory manual**. 1ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995. 714p.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdã, v.127, p.285-294, 1966.
- DROUAULT, S.; CORTHIER, G.; EHRLICH, S.D.; RENAULT, P. Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.4881-4886, 1999.
- EADY, R.R.; SMITH, B.E.; COOK, K.A. & POSTGATE, J.R. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the component proteins. **Biochem.J.**, v.128, p.655-75, 1972.
- EADY, R.R. & POSTGATE, J.R. Nitrogenase. **Nature**, v.245. p. 805-10, 1974.
- EADY, R.R. Enzymology in free-living diazotrophs. In: BRPUGHTON, W.J.; PULHER, S., **Nitrogen Fixation**, v.4. Oxford: Clarendon Press, 1986. p.1-49.
- EADY, R.R.; RICHARDSON, T.H.; MILLER, R.W.; HAWKINS, M. & LOW, D.J. The vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*: purification and properties of the Fe protein. **Biochem. J.** v.256, p. 189-96, 1988.
- EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas princípios e perspectivas**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1975. 341p.

- FALK, E.C.; JOHNSTON, J.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. & KRIEG, N. R. Desoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.36, p.80-5, 1986.
- FLEISCHMANN, R.D.; ADAMS, M.D.; WHITE, O.; CLAYTON, R.A.; KIRKNESS, E.F.; KERLAVAGE, A.R. ; BULT, C.J.; TOMB, J.F.; DOUGHERTY, B.A.; MERRICK, J.M.; McKENNEY, K.; SUTTON, G.; FRITZHUGH, W.; FIELDS, C.; GOCAYNE, J.D.; SCOTT, J.; SHIRLEY, R.; LIU, L.I.; GLODEK, A.; KELLEY, J.M. WEIDMAN, J.F.; PHILLIPS, C.A.; SPRIGGS, T.; HEDBLUM, E.; COTTON, M.D.; UTTERBACK, T.R.; HANNA, M.C.; NGUYEN, D.T.; SAUDEK, D.M.; BRANDON, R.C.; FINE, L.D.; FRITZCHMAN, J.L.; FUHRMAN, J.L.; GEOGHAGEN, N.S.M.; GNEHM, C.L. McDONALD, L.A.; SMALL, K.V.; FRASER, C.M.; SMITH, H.O.; VENTER, J.C. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, Washington, v.269, p.496-512, 1995.
- GALVÃO, C.W. **Sequenciamento, mutagênese e caracterização dos genes *recA* e *recX* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2001. 91p. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- GOURLEY, D.G.; SCHUTTELKOPF, A.W.; ANDERSON, L.A.; PRICE, N.C.; BOXER, D.H.; HUNTER, W.N. Oxyanion binding alters conformation and quaternary structure of the C-terminal domain of the transcriptional regulator ModE. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.23, p.20641-20647, 2001.
- GOVANTES, F.; MOLINA-LOPEZ, J.A.; SANTERO, E. Mechanism of coordinated synthesis of the antagonistic regulatory proteins NifL and NifA of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n.23, p.6817-6823, 1996.
- GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Res.** v. 65, p. 93-106, 2000.

- GRANT, S.G.N.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 87, p.4645-4649, 1990.
- GRUNDEN, A.M.; RAY, R.M.; ROSENTEL, J.K.; HEALY, F.G.; SHANMUGAM, K.T. Repression of the *Escherichia coli modABCD* (molybdate transport) operon by ModE. **J. Bacteriol.**, Washington, v.178, n. 3, p.735-744, 1996.
- GRUNDEN, A.M. & SHANMUGAM, K.T. Molybdate transport and regulation in bacteria. **Arch. Microbiol.**, v.168, p.345-354, 1997.
- GRUNDEN, A.M.; SELF, W.T.; VILLAIN, M.; BLALOCK, J.E.; SHANMUGAM, K.T. An analysis of the binding repressor protein ModE to *modABCD* (molybdate transport) operator/promoter DNA of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.274, n.34, p. 24308-24315, 1999.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v.41, p.95-98, 1999.
- HASONA, A.; SELF, W.T.; RAY, R.M.; SHANMUGAM, K.T. Molybdate-dependent transcription of *hyc* and *nar* operons of *Escherichia coli* requires MoeA protein and ModE-molybdate. **FEMS Microbiol. Lett.** v.169, p.111-6, 1999.
- HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v,22, p.4673-4680, 1994.
- HOWARD, J.B.; REES, D.C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p.235-264, 1994.

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

IMPERIAL, J.; HADI, M.; AMY, N.K. Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli mod* molybdate transport system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1370, p.337-346, 1998.

JOHNSTON, T.C.; THOMPSON, R.B.; BALDWIN, T.O. Nucleotide sequence of the *luxB* gene of *Vibrio harveyi* and complete amino acid sequence of the β subunit of bacterial luciferase. **J. Biol. Chem.**, v.261, p.4805-4811, 1986.

KADO, C.I. & LIU, S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **J. Bacteriol.** Washington, v. 145, n.3, p.1365-1373, 1981.

KIM, J.; WOO, D.; REES, D.C. X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0 Å resolution. **Biochemistry**, v.32, p. 7104-7115, 1993.

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

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

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

- 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.
- KUHN, J.; SUISSA, M.; WYSE, J.; COHEN, I.; WEISER, I.; REZNICK, S.; LUBINSKY-MINK, S.; STEWART, G.; ULITZUR, S. Detection of bacteria using foreign DNA: the development of a bacteriophage reagent for Salmonella. **Int J Food Microbiol.**, v. 74, p.229-238, 2002.
- LI, Z.; SZITTNER, R.; MEIGHEN, E.A. Subunit interactions and the role of the luxA polypeptide in controlling thermal stability and catalytic properties in recombinant luciferase hybrids. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1158, p.137-145, 1993.
- LI, Z.; MEIGHEN, E. The turnover of bacterial luciferase is limited by a slow decomposition of the ternary enzyme-product complex of luciferase, FMN, and fatty acid. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.9, p.6640-6644, 1994.
- LUQUE, F.; MITCHENALL, L.A.; CHAPMAN, M.; CHRISTINE, R.; PAU, R.N. Characterization of genes involved in molybdenum transport in *Azotobacter vinelandii*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.7, n.3, p.447-459, 1993.
- MACHADO, H.B.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are a part of a *nifR* 3-like-*ntrBntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.41, p.674-84, 1995.
- MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.29, n.12, p.1599-1602, 1996.

- MANCINI, J.A.; BOYLAN, M.; SOLY, R.R.; GRAHAM, A.F.; MEIGHEN, E.A. Cloning and expression of the *Photobacterium phosphoreum* luminescence system demonstrates a unique *lux* gene organization. **J. Biol. Chem.**, v.263, n. 28, p.14306-14314, 1988.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1 ed. 1982. 545p.
- MAO, C.; YANG, S.; ZHAO, M. Expression of fused *luxAB* gene of bacterial luciferase in liver carcinoma cells. **Zhohghua Zhong Liu Za Zhi.**, v.23, p. 359-362, 2001.
- MAUPIN-FURLOW, J.A.; ROSENTEL, J.K.; LEE, J.H.; DEPPENMEIER, U.; GUNSALUS R.P.; SHANMUGAM, K.T. Genetic analysis of the *modABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.177, n.17, p.4851-4856, 1995.
- McNICHOLAS, P.M.; CHIANG, R.C.; GUNSALUS, R.P. The *Escherichia coli modE* gene: effect of *modE* mutations on molybdate dependent *modA* expression. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.145, p.117-123, 1996.
- McNICHOLAS, P.M.; MAZZOTTA, M.M.; RECH, S.A.; GUNSALUS, R.P. Functional dissection of the molybdate-responsive transcription regulator, ModE, from *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, n.17, p.4638-4643, 1998.
- MEIGHEN, E. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. **The FASEB Journal.**, v.7, p.1016-1022, 1993.
- MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes, In: PALACIOS, R.; MARA, J.; NEWTON, W.E.(eds). **New horizons in nitrogen fixation**. Netherlands, Nijhoff Publishers, 1992, p.1-12.

- MERRICK, M.J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, n.4, p.604-622, 1995.
- MILLER, J.H. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992, 456p.
- MOUNCEY, N.J.; MITCHENALL, L.A.; PAU, R.N. Mutational analysis of genes of the *mod* locus involved in molybdenum transport, homeostasis, and processing in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, n.18, p.5294-5302, 1995.
- MOUNCEY, N.J.; MITCHENALL, L.A.; PAU, R.N. The *modE* gene product mediates molybdenum-dependent expression of genes for the high-affinity molybdate transporter and *modG* in *Azotobacter vinelandii*. **Microbiology**, v.142, p.1997-2004, 1996.
- MYAMOTO, C.M.; BOYLAN, M.; GRAHAM, A.F.; MEIGHEN, E.A. Organization of the *lux* structural genes of *Vibrio harveyi*. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.26, p.13393-13399.
- NEYRA, C.A.; VAN BERKUN, P. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa v.23, p.306-310, 1977.
- NOINDORF, L. **Clonagem, sequenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2002. 105p. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- PEDROSA, F.O.; BENELLI, E.M.; YATES, M.G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R.A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U. Recent developments in the structural organization and regulation of

nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.**, v. 9, n.2-3, p.189-195, 2001.

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

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

POSTGATE, J.R. **Fixação do nitrogênio**. São Paulo, EPU, v.32, 1989, 84p.

PRESTON, G.G. & LUDDEN, P.W. Change in subunit composition of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* during activation of iron protein. **Biochem. J.**, v.205, p.489-94, 1983.

RECH, S.; DEPPENMEIER, U.; GUNSALUS, R.P. Regulation of the molybdate transport operon, *modABCD*, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. **J. Bacteriol.**, v.177, p.1023-1029, 1995.

REGO, F.G.M. **Sequenciamento do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterização da sua região promotora**. Curitiba, 1997. 143p. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RIENDEAU, D.; MEIGHEN, E. Co-induction of fatty acid reductase and luciferase during development of bacterial bioluminescence. **J. Biol. Chem.**, v.255, p.12060-12065, 1980.

RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; PEDROSA, F.O. Mutagenesis and nucleotide sequence of the glutamine synthetase structural gene of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVª REUNIÃO

ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1996: Caxambu). **Resumos...** Caxambu, 1996. p.49

RIVERA-ORTIZ, J.M. & BURRIS, R.H. Interaction among substrates and inhibitors of nitrogenase. **J. Bacteriol.** v. 123, p.534-47, 1975.

ROBERTS, G.P.; 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, n.1, p.267-279, 1978.

ROBEY, R.B.; OSAWA, H.; PRINTZ, R.L.; GRANNER, D.K. Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. **BioTechniques**. v.20, p.42-44, 1996.

ROSENTEL, J.K.; HEALY, F.; MAUPIN-FURLOW, F.A.; LEE, J.H.; SHANMUGAN, K.T. Molybdate and regulation of *mod* (molybdate transport), *fdhF*, and *hyc* (formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.177, p.4857-4864, 1995.

RUBINSON, J.F.; CORBIN, J.L. & BURGESS, B.K. Nitrogenase reactivity: methyl isocyanide as substrate and inhibitor. **Biochemistry**, v.22, p.6260-68, 1983.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**. v.74, p.5463-67, 1977.

SCHÖLLORN, R. & BURRIS, R.H. Acetylene as competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.58, p.213-16, 1967.

SELF, W.T.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K.T. N-terminal truncations in the FhIA protein result in formate- and MoeA-independent expression of the *hyc* (formate

hydrogenlyase) operon of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.147, p.3093-4004, 2001.

SCHULTZ, J.; MILPETZ, F.; BORK, P.; PONTING, C.P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**,v.95,p.5857-5864,1998.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering transposon mutagenesis in gram-negatives bacteria. **Biotechnology**, v.1, p.748-91, 1983.

SIMON, R.; QUANDT, J.; KLIPP, W. New derivatives of transposon tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operons fusions and induction of genes in Gram-positive bacteria. **Gene**, Cambridge, v.80, p. 161-169, 1989.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, Washington, v.224, p. 1095-1096, 1984.

SIZEMORE, C.; GEISSDORFER, W.; HILLEN, W. Using fusions with *luxAB* from *Vibrio harveyi* MAV to quantify induction and catabolite repression of the *xyI* operon in *Staphylococcus carnosus* TM300. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.107, p.303-306, 1993.

SOUZA, E.M. **Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 1990. 264 f. Tese (Doutorado em Ciências- Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 37, n.6, p.425-429, 1991a.

- SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F. O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.137, p.1511-1522, 1991b.
- SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERGER, B.J.J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Molec. Biol.**, v. 9, p.27-39, 1987.
- STADEN, R. An interactive graphic program for comparing and aligning nucleic acid and amino acid sequences. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 10, p.2951-2961, 1982.
- STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S.; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; PEDROSA, F.O. Cloning of a *recA* like gene from the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.39, p. 1096-1102, 1993.
- STEFFENS, M.B.R. **Clonagem, isolamento e caracterização do gene *recA* de *H. seropedicae* estirpe Z78.** Curitiba, 1994. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; PERSHUN, D.C.; RIGO, L.U. Sequence analysis of the regulatory genes *ntrB* and *ntrC* of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVIª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997: Caxambu). **Resumos...** Caxambu. 1997. p.50.
- SZITTNER, R.; MEIGHEN, E. Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by *lux* genes from a terrestrial bacterium. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.16581-16587, 1990.
- TARTOFF, K.D.; HOBBS, C.A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. Bethesda **Res. Lab. Focus.** v.9, p.12, 1987.

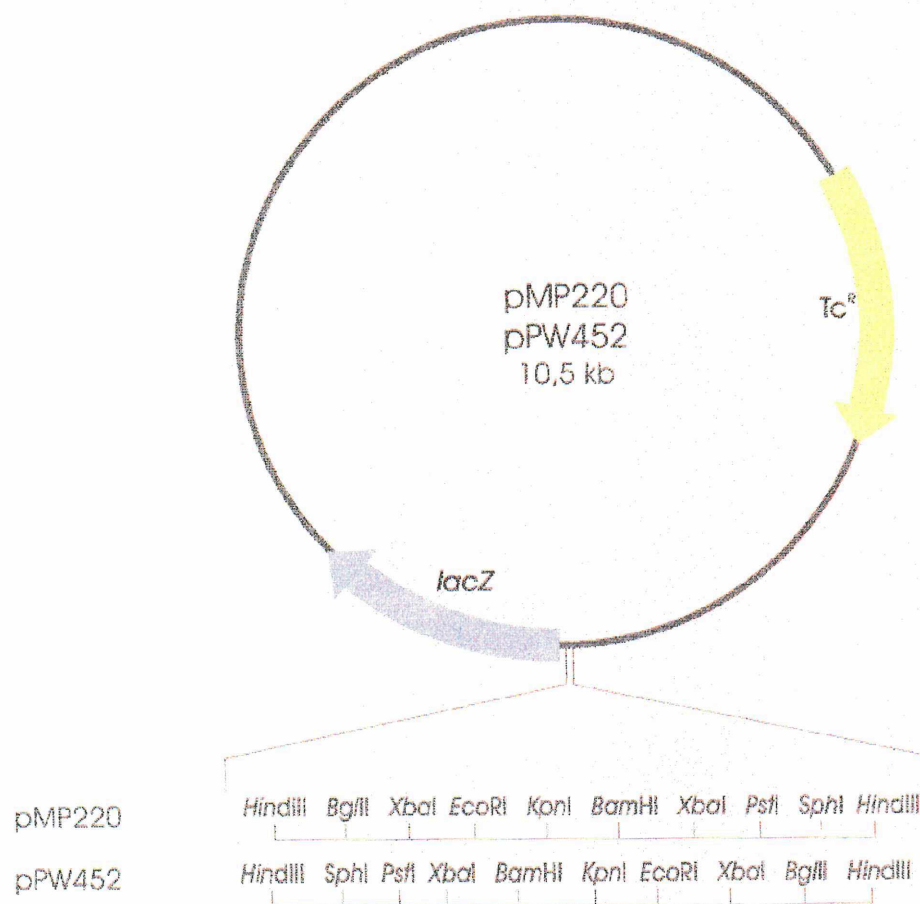
- TEIXEIRA, K.R.S. **Isolamento e caracterização do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae* Z78.** Curitiba, 1991. Tese (Mestrado em Ciências- Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- THORNELEY, R.N.F. & EADY, R.R. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: distinction between proton-reducing and acetylene-reducing forms of the enzyme: effect of temperature and component protein ratio on substrate reduction kinetics. **Biochem. J.** v.167, n.2, p.457-61, 1977.
- VISICK, K.L.; FOSTER, J.; DOINO, J.; McFALL-NGAL, M.; RUBY, E.G. *Vibrio fischeri lux* genes play an important role in colonization and development of the host light organ. **J. Biol. Chem.**, v.182, n.16, p.4578-4586, 2000.
- VOIGT, E.L. **Identificação e análise estrutural de genes a montante do gene *nifA* em *Herbaspirillum seropedicae*.** Curitiba, 2000. Tese (Mestrado em Ciências– Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- WANG, G.; ANGERMÜLLER, S.; KLIPP, W. Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding protein. **J. Bacteriol.**, Washington, v.175, n.10, p.3031-3042, 1993.
- WASSEM, R. **Regulação da transcrição do gene *nifA* de *Herbaspirillum seropedicae* pelas proteínas NTRC, NIFA e IHF.** Curitiba, 1999. Tese (Doutorado em Ciências- Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; Döbereiner, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from

banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.210, n.1, p.103-113, 1999.

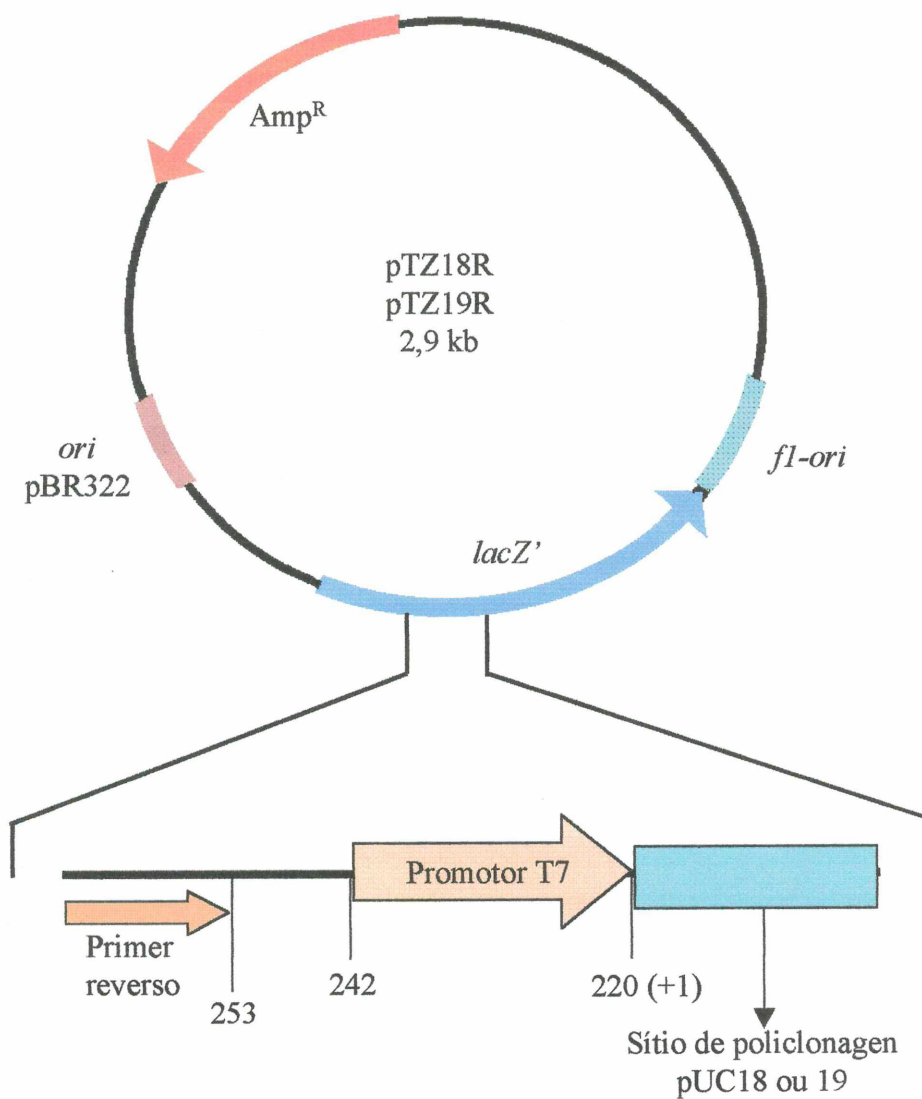
WOOTTON, J.C.; NICOLSON, R.E.; COCK, J.M.; WALTERS, J.E.; BURKE, J.F.; DOYLE, W.A.; BRAY, R.C. Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. **Biochem. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1057, p.157-185, 1991.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STALEY, G.; BURRIS, R.M.; EVANS, H.S. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p.43-86.

Anexo I – Mapa do vetor pMP220 e pPW452 (SPAINK *et al.*, 1987)



Anexo II – Mapa esquemático do vetor pTZ18/19R (MEAD *et al.*, 1986)



ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GAT CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG GCC
EcoRI *SacI* *KpnI* *SmaI* *BamHI* *XbaI* *SalI* *PstI* *SphI* *HindIII*

ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG AAT TCA CTG GCC
HindIII *SphI* *PstI* *SalI* *XbaI* *BamHI* *SmaI* *KpnI* *SacI* *EcoRI*