

FABIANE GOMES DE MORAES REGO

SEQÜENCIAMENTO DO GENE *nifB* DE *Herbaspirillum*
seropedicae E CARACTERIZAÇÃO DA SUA
REGIÃO PROMOTORA

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

CURITIBA

1997

FABIANE GOMES DE MORAES REGO

**SEQUENCIAMENTO DO GENE *nifB* DE *Herbaspirillum seropedicae*
E CARACTERIZAÇÃO DA SUA REGIÃO PROMOTORA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (Orientador)

Prof. Dra. Glaci Terezinha Zancan

Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens

Curitiba, 28 de novembro de 1997

Orientadores:

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

À minha família

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos professores Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela orientação. Ao professor Fábio pela oportunidade de trabalhar no laboratório, carinho, compreensão e orientação. Ao Emanuel pela paciência, compreensão, amizade e principalmente pela oportunidade de poder trabalhar ao seu lado, um exemplo de profissional, cientista e ser humano, com qualidades admiráveis com quem aprendi, aprendo e respeito cada vez mais.

Gostaria de agradecer todas as pessoas que compõem o grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio, professores, alunos e funcionários que contribuíram de forma valorosa para a realização desta tese e que seguramente sem estas pessoas não poderia ter sido realizada. Em especial a professora Dr^a. Leda Satie Chubatsu, professora Dr^a. Liu Un Rigo, professor Dr. Shigehiro Funayama, Giseli, Maria Lúcia e Valter. A Leda obrigada pela orientação durante uma fase da tese, pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação e competência e principalmente pela amizade. Gi, por ter sempre sido tão solícita e amiga. Meri, principalmente pela ajuda na confecção das figuras da tese. E Valter por sempre ter colaborado com meu trabalho, mesmo fora de seu horário.

Aos mais verdadeiros amigos que nos momentos mais difíceis estavam ao meu lado, que me ajudaram de tal forma que um simples agradecimento não seria suficiente retribuí-los com a mesma dedicação. Obrigado Lauren, Rose Adele, Emanuel, Leda, Cynthia e em especial Roseli, Patricia e Elaine.

Ao Geoff e Bere pela ajuda e pelos vários gestos de carinho no decorrer deste período.

Gostaria de agradecer em especial duas pessoas, que por mais que eu tente talvez nunca conseguirei retribuir a amizade, confiança, incentivo, carinho e principalmente paciência, Cynthia e Geraldo.

Agradeço também a todos os professores, funcionários, colegas e a chefe do Departamento de Bioquímica na pessoa da Dra. Glaci Zancan.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pelos auxílios prestados e o apoio financeiro a CAPES, CNPq, FINEP/BID e PRONEX.

E principalmente a meus pais, que são meus maiores exemplos de dignidade, responsabilidade e respeito.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xvii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio	04
1.1.1 Bioquímica da Fixação de Nitrogênio	04
1.1.1.1 Nitrogenases Alternativas	07
1.2.2 Genética de Fixação de Nitrogênio	09
1.1.2.1 Genes <i>nif</i>	09
1.2.2.2. Genes <i>fix</i>	19
1.1.3 Síntese do Cofator FeMo	20
1.1.4 Regulação da Fixação de Nitrogênio	21
1.1.4.1 Regulação da Expressão dos Genes <i>nif</i>	21
1.1.4.1.1 Regulação dos Genes <i>nif</i> através de Proteínas NifA e NifL	24
1.1.4.1.2 Regulação da Expressão dos Genes <i>nif</i> pelo Sistema <i>ntr</i>	27
1.1.4.2 Regulação da atividade de Nitrogenase	32

1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	35
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Microrganismos e Plasmídeos	41
3.2 Reagentes	41
3.3 Antibióticos	44
3.4 Meios de Cultura	44
3.5 Purificação de DNA	47
3.5.1 Mini Preparação de Plasmídeos (mini-prep)	47
3.5.2 Maxi Preparação de Plasmídeos (maxi-prep)	48
3.5.3 Purificação de DNA Total de <i>H. seropedicae</i>	49
3.6 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose	49
3.7 Digestão de DNA com Enzimas de Restrição	50
3.8 Ligação dos Fragmentos de DNA	50
3.9 Transformação Bacteriana por Choque Térmico de <i>E. coli</i>	51
3.10 Eletroporação Bacteriana por Choque Elétrico de <i>E. coli</i>	52
3.11 Conjugação Bacteriana	53
3.12 Estratégia para Sequenciamento da Porção Final do Gene <i>nifB</i>	54
3.13 Obtenção de Deleções para o Sequenciamento	55
3.14 Produção de DNA Fita Simples para Sequenciamento	56
3.15 Purificação de DNA Fita Simples para Sequenciamento	56
3.16 Purificação de DNA Fita Dupla para Sequenciamento	57
3.17 Sequenciamento	58

3.18 Obtenção do Fragmento Contendo o Promotor <i>nifB</i> e Marcação com ^{32}P	58
3.19 Superexpressão e Purificação Parcial da Proteína NifA de <i>K. pneumoniae</i>	60
3.20 Purificação da Proteína RpoN de <i>K. pneumoniae</i>	61
3.20.1 Preparo da Cultura e do Extrato Livre de Células	61
3.20.2 Cromatografia em Coluna de DEAE-Cellulose	62
3.20.3 Fracionamento com Sulfato de Amônio	62
3.20.4 Cromatografia em Coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow	63
3.20.5. Concentração com Sulfato de Amônio	63
3.20.6 Cromatografia em Superose 12	64
3.21 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante com SDS	64
3.22 Ensaio de Retardamento Eletroforético do <i>pnifB</i> pela Proteína NifA ou RpoN	64
3.24 Métodos Analíticos	65
3.24.1 Determinação da Atividade de β -Galactosidase	65
3.24.2 Dosagem de Proteínas	66
3.24.3 Dosagem de Oxigênio Molecular	66
3.24.4 Quantificação de DNA por espectrofotometria	67
4 RESULTADOS	68
4.1 Sequenciamento do Gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	68
4.2 Clonagem e Sequenciamento da Região a Juzante de Gene <i>nifB</i>	72
4.3 Estudo da Regulação do Gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	75
4.3.1 Regulação do Promotor <i>nifB</i> em Fusão Plasmideal	76
4.3.1.1 Estudo da Regulação do Gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> em Estirpes de <i>E. coli</i>	77

4.3.1.2 Estudo da Regulação do Gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> em Estirpes de <i>H. seropedicae</i>	77
4.3.2 Regulação do Promotor <i>nifB</i> em Fusões Cromossomais em <i>H. seropedicae</i>	78
4.4 Superexpressão e Purificação Parcial da Proteína NifA de <i>K. pneumoniae</i>	81
4.5 Superexpressão da Proteína RpoN	83
4.6 Purificação da Proteína RpoN de <i>K. pneumoniae</i>	83
4.6.1 Cromatografia em Coluna de DEAE-Cellulose	84
4.6.2 Cromatografia em Coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow	84
4.6.3 Cromatografia em Coluna de Superose 12	85
4.7 Ensaio de Retardamento Eletroforético do <i>pnifB</i> -Proteína NifA ou RpoN	87
4.7.1 Ensaio de Retardamento Eletroforético do complexo <i>pnifB</i> -Proteína NifA	87
4.7.2 Ensaio de Retardamento Eletroforético do complexo <i>pnifB</i> -Proteína RpoN	88
5 DISCUSSÃO	92
6 CONCLUSÕES	97
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização Estrutural dos Genes <i>nif</i> em <i>K. pneumoniae</i>	11
Figura 2. Mecanismo de Regulação da Expressão dos Genes <i>nif</i> em <i>K. pneumoniae</i>	33
Figura 3 Sequência de Nucleotídeos do Gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	69
Figura 4 Comparação entre as Sequências de Aminoácidos das Proteínas NifB de <i>H. seropedicae</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>K. pneumoniae</i>	74
Figura 5. Alinhamento da Sequência de Aminoácidos Deduzida da Sequência de Nucleotídeos obtida do plasmídeo pFR1 com a da <i>orf4</i> de <i>Rhodobacter capsulatus</i> da região do gene <i>nifX</i> .	75
Figura 6. Representação Esquemática do Plasmídeo pEMS140	77
Figura 7. Eletroforetograma de Proteínas em Gel de SDS-PAGE dos Extratos Livre de Células das Estirpes de <i>E. coli</i> Expressando a Proteína NifA de <i>K. pneumoniae</i>	82

Figura 8. Eletroforetograma de Proteínas em Gel de SDS-PAGE das Etapas de Purificação da Proteína RpoN 86

Figura 9. Ensaio de Retardamento em Gel do Complexo Promotor *nifB*-Proteína NifA 89

Figura 10. Efeito da Concentração da Proteína RpoN na Formação do Complexo Promotor *nifB*-RpoN 90

Figura 11. Efeito do DNA Competidor Homólogo na Formação do Complexo Promotor *nifB*-RpoN 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estipes e plasmídeos	42
Tabela 2 Similaridade e identidade da proteína NifB de <i>H. seropedicae</i> com a de proteínas homólogas de outros microrganismos	70
Tabela 3 Expressão do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> em estirpes de <i>E. coli</i>	79
Tabela 4. Efeito do Oxigênio e Íons Amônio sobre a Expressão do gene <i>nifB</i> em <i>H. seropedicae</i> a partir de fusão a partir de fusão plasmideal	80
Tabela 5. Expressão do gene <i>nifB</i> em <i>H. seropedicae</i> é Dependente da Proteína NifA	81
Tabela 6. Tabela de purificação da proteína RpoN	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
AMP	monofosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
bp	pares de bases
Cys	cisteína
D.O.	densidade ótica
Da	Dalton
DEAE-Cellulose	dietilaminoetil celulose
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dATP	5'-trifosfato de 2'-desoxiadenosina
dNTP	5'-trifosfato de 2'-desonucleosídeos
dTTP	5'-trifosfato de timidina
DTT	ditiotreitol

EDTA	ácido etilenodiamino-tetra-acético
FPLC Chromatography	cromatografia líquida de performace rápida (F ast P erformance L iquid)
His	histidina
Kb	kilo base (1000 pares de bases)
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
ORF	fase aberta de leitura (O pen R eadin G F rame)
Pi	fosfato
pfu	unidade formadora de colônia
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
q.s.p	quantidade suficiente para
RBS	sítio de ligação ao ribossomo (R ibosome B inding S ite)
RNA	ácido ribonucleico
RNAse	ribonuclease
rpm	rotações por minuto

UV

ultravioleta

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é um diazotrofo endofítico encontrado em associação com várias gramíneas. O gene *nifB* de *H. seropedicae* foi sequenciado e a proteína NifB deduzida da sequência de nucleotídeos apresentou uma identidade de 62 % com a de *Bradyrhizobium japonicum*, 57% com a de *R. capsulatus* e 47% com a de *Klebsiella pneumoniae*. A região promotora apresenta sítios de ligação para a proteína NifA e para a RNA polimerase-RpoN (σ^N). Para se determinar o envolvimento das proteínas NifA e RpoN na ativação do promotor *nifB* de *H. seropedicae*, uma fusão plasmidial *nifB::lacZ* (pEMS140) foi construída e a expressão do promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae* analisada nas estirpes TH1 ($rpoN^-$) e ET8894 ($rpoN^+$) de *Escherichia coli* e nas estirpes SmR1 (selvagem) e SmR54 (*nifA*⁻) de *H. seropedicae*. Uma fusão cromossomal *nifB::lacZ* foi construída originando a estirpe de *H. seropedicae* SmR2126. Posteriormente, o gene *nifA* desta estirpe foi inativado por inserção do gene de resistência à canamicina originando a estirpe Smr2126/1 (*nifB::lacZ*, *nifA::Km*). Em *E. coli*, o promotor *nifB* foi ativo apenas na presença das proteínas NifA (expressa constitutivamente pelo pMC71A) e RpoN de *K. pneumoniae*. Em *H. seropedicae*, o gene *nifB* foi expresso apenas baixas tensões de oxigênio e ausência de íons amônio nas estirpes SmR1 contendo o plasmídeo pEMS140 (selvagem) e SmR2126 (*nifB::lacZ*). Juntos estes resultados indicam que a expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae* requer as proteínas NifA e RpoN. Ensaios de retardamento em gel mostraram que tanto a proteína NifA quanto a RpoN de *K. pneumoniae* foram capazes de se ligar a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um nutriente essencial para as plantas e animais e corresponde a 78% da atmosfera na forma de nitrogênio molecular ou dinitrogênio (N_2). Nesta forma é metabolicamente indisponível para aqueles organismos. Entretanto, muitas espécies de microrganismos podem converter o dinitrogênio atmosférico a íons amônio pela ação da enzima nitrogenase, em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio. Estes microrganismos capazes de fixar nitrogênio são chamados de diazotrofos (van BERKUM *et al.*, 1980; POSTGATE, 1982a).

A habilidade de fixar nitrogênio e o crescimento diazotrófico são encontrados somente em procariotos, que podem ser aeróbios facultativos, aeróbios obrigatórios e anaeróbios. Eles podem ser, autotróficos, heterotróficos, mixotróficos, fotoautotróficos, fotorganotróficos, oxidantes de hidrogênio ou metanotróficos (POSTGATE, 1982a).

Os microrganismos que fixam nitrogênio independentemente de outros organismos são denominados de vida livre e, se não forem fotossintetizantes, requerem uma fonte de energia química, enquanto que os diazotrofos fotossintetizantes utilizam energia solar. A amônia produzida por estes organismos é exclusiva para seu próprio consumo, não sendo liberada para o ambiente. Pertencem a este grupo as bactérias do gênero *Azotobacter* e as enterobactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter agglomerolans* (PEDROSA, 1987).

Os microrganismos fixadores de nitrogênio associativos vivem em íntima proximidade com as raízes das plantas (na rizosfera ou dentro da planta) e podem obter materiais energéticos das plantas. Estes microrganismos podem contribuir com nitrogênio

fixado para a planta ou ainda estimular o crescimento de raízes pela produção de fitohormônios (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). Espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Acetobacter* são encontrados associadas às gramíneas (milho, arroz, sorgo, trigo, etc) e são exemplos do sistema associativo (van BERKUM *et al.*, 1980; PATRIQUIM *et al.*, 1983; PEDROSA, 1987).

A relação simbiótica entre rizóbia e leguminosas ocorre dentro de estruturas especializadas chamadas de nódulos, na sua maioria localizadas nas raízes e, em alguns casos, no caule. A planta fornece materiais energéticos aos diazotrofos e, em troca, recebe o nitrogênio fixado pelo microrganismo. Entre os diazotrofos simbióticos encontram-se microrganismos dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Frankia* (POSTGATE, 1982a; PEDROSA, 1987).

As plantas superiores e animais obtêm compostos nitrogenados primariamente gerados por microrganismos fixadores ou de fertilizantes. Ocorre ainda uma pequena taxa de fixação de nitrogênio atmosférico catalisada por descargas elétricas. Porém, o nitrogênio disponível no solo não supre a demanda da produtividade agrícola atual, o que levou ao aumento exponencial da utilização de fertilizantes nitrogenados, principalmente na forma de nitrato, nas últimas três décadas. A utilização indiscriminada de compostos nitrogenados na agricultura traz riscos consideráveis, além de ser dispendiosa. Em primeiro lugar, o nitrato, devido a sua alta solubilidade, é lavado do solo para rios, lagos e lençóis freáticos causando uma alta contaminação dos reservatórios de água potável. A redução parcial de nitrato a óxido nitroso aumenta a quantidade deste gás na atmosfera que, junto com o CO₂, diminui a perda de calor pela terra, causando aumento de temperatura global. Além disso, a síntese industrial de NH₄⁺ através do processo de Haber requer altas temperaturas e pressões, obtidas da queima de combustível fóssil e acarretando elevada emissão de CO₂ na atmosfera

(van BERKUM *et al.*, 1980; POSTGATE, 1982a; PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1992b; BODDEY *et al.*, 1995; DÖBEREINER 1997). Uma alternativa mais barata e ecologicamente aceitável ao uso de fertilizantes nitrogenados é o uso da fixação biológica de nitrogênio. A dificuldade neste caso é a especificidade da relação planta-microrganismo. Assim, a cultura de soja pode ser inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* que faz uma associação simbiótica altamente produtiva, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. Calcula-se que apenas no Brasil cerca de 3 bilhões de dólares são economizados em fertilizantes nitrogenados graças a fixação de nitrogênio de *Bradyrhizobium* associado a soja (PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1997). Por outro lado, não se conhece nenhum diazotrofo que se associe simbioticamente com muitas culturas economicamente importantes como trigo, milho, cana-de-açúcar e arroz.

Recentemente, diazotrofos como o *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp foram encontrados em tecidos vasculares de cana-de-açúcar, sugerindo uma associação endofítica (DÖBEREINER, 1993; DÖBEREINER, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1995; OLIVARES *et al.*, 1996). Estes achados sugerem uma explicação para o fato de áreas de culturas de cana-de-açúcar permanecem produtivas por décadas ou séculos sem exaustão das reservas de nitrogênio do solo ou declínio de produtividade. Pelo menos para certas variedades de cana-de-açúcar, a fixação biológica de nitrogênio parece ser suficiente para garantir uma produção duradoura (DÖBEREINER, 1993; FRANCO & DÖBEREINER, 1994; BODDEY *et al.*, 1995; DÖBEREINER 1997).

Além disso, uma variedade de cereais capazes de serem colonizados por diazotrofos endofíticos tem sido identificados e já foi demonstrado que estas culturas utilizam fertilizantes nitrogenados em uma taxa inferior ao seu requerimento teórico (DÖBEREINER, 1992b; DÖBEREINER, 1997). Várias espécies de microrganismos foram

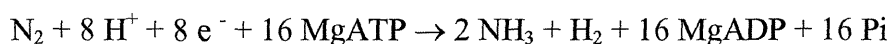
isoladas, especialmente *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e certas estirpes de *Azospirillum* spp, colonizando raízes, caules e folhas de milho, *Pennisetum* e arroz (DÖBEREINER, 1992b; BODDEY, 1995; DÖBEREINER, 1997).

1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

1.1.1 Bioquímica da Fixação de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é catalisada pelas nitrogenases, enzimas que os sistemas biológicos utilizam para processar o dinitrogênio atmosférico (LEIGH, 1997).

A redução do substrato pela nitrogenase consiste basicamente de três reações de transporte de elétrons. Primeiramente, a proteína ferro é reduzida por transportadores de elétrons, tais como flavodoxinas ou ferredoxinas (*in vivo*) e ditionito (*in vitro*); posteriormente ocorre a transferência de elétrons da proteína Fe para a proteína MoFe, reação dependente da hidrólise de 2 MgATP por elétron transferido; e, finalmente, ocorre a transferência de elétrons ao substrato (KIM & RESS, 1994). Sob condições ótimas, a estequiometria da redução de dinitrogênio pela nitrogenase é representada pela seguinte reação (SIMPSON & BURRIS, 1984):



A nitrogenase catalisa a redução também de outros substratos alternativos além do dinitrogênio tais como o acetileno, a azida ou o cianeto (KELLY *et al.*, 1967; SCHÖLLHORN & BURRIS, 1967; LOWE *et al.*, 1978).

A enzima nitrogenase é um complexo constituído de duas metalo-proteínas (POSTGATE, 1982b; PETERS *et al.*, 1995). Estas duas metalo-proteínas são denominadas proteína ferro (proteína Fe ou dinitrogenase redutase) e proteína molibdênio-ferro (proteína MoFe ou dinitrogenase) devido ao tipo de seus constituintes metálicos (DEAN *et al.*, 1993).

Em *A. vinelandii* a proteína Fe é codificada pelo gene *nifH* e é um homodímero constituído de duas subunidades γ , ligadas por um núcleo [4Fe-4S] simetricamente coordenado pelas cisteínas das posições 97 e 132 de cada subunidade (HOWARD *et al.*, 1989). Esta proteína apresenta uma massa molecular de aproximadamente 60 kDa e suas propriedades estruturais e funcionais são muito conservadas entre os diferentes diazotrofos (HOWARD & REES, 1994). Uma das duas principais características funcionais da proteína Fe é a capacidade de ligação dos nucleotídeos MgATP e MgADP. Cada subunidade apresenta um domínio tipo α -hélice/folha β -pregueada (GEORGIADIS *et al.*, 1992), constituindo um motivo comumente encontrado em proteínas que se ligam a nucleotídios. Este motivo estrutural é caracterizado pela sequência de aminoácidos consenso GXXXXGKS, denominada motivo A de Walker (HOWARD & REES, 1994; KIM & REES, 1994). A proteína Fe ainda apresenta um segundo sítio funcional, o núcleo [4Fe-4S], que sofre um ciclo redox entre os estados $[2\text{Fe}^{2+}2\text{Fe}^{3+}]$ e $[3\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]$ (MORGAN *et al.*, 1990; PETERS *et al.*, 1995).

A proteína Fe difere das outras proteínas ferro enxofre quanto a sensibilidade ao oxigênio. Isto ocorre porque o núcleo [4Fe-4S] da nitrogenase é mais exposto e também pela mudança de ambiente químico que o núcleo sofre devido a mudança conformacional da proteína decorrente de sua ligação ao MgATP (MORGAN *et al.*, 1990; PETERS *et al.*, 1995). Esta importante característica da proteína Fe obriga os diazotrofos aeróbios a

encontrar formas de proteger a nitrogenase do oxigênio (POSTGATE, 1982a; PEDROSA, 1988; YATES, 1987).

A proteína MoFe apresenta massa molecular de aproximadamente 240 kDa e é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$. As subunidades α e β são codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente (KIM & REES, 1994). Dois centros metálicos fazem parte desta proteína: o cofator FeMo e um par de centros P. O cofator FeMo, primeiramente identificado por Shah & Brill (1977) como um centro metálico estável à desnaturação ácida da proteína MoFe, tem fórmula molecular $\text{Mo}_1\text{Fe}_7\text{S}_9$ e coordena uma molécula de homocitrato (HOWARD & REES, 1994; KIM & REES, 1994). O cofator FeMo está contido no interior da subunidade α da proteína MoFe, interagindo com apenas dois ligantes proteicos, os resíduos $\alpha\text{Cys } 275$ e $\alpha\text{His } 442$ (KIM & REES, 1994; PETERS *et al.*, 1995; REES *et al.*, 1997). O centro P pode ser considerado um núcleo Fe_8S_8 onde dois núcleos Fe_4S_4 estão ligados por pontes tiol dos resíduos cisteínas $\alpha 88$ e $\beta 95$ da proteína MoFe da *A. vinelandii* e ainda por uma ponte dissulfeto de dois átomos de enxofre inorgânico (HOWARD & REES, 1994; SMITH, *et al.* 1995).

O fluxo de elétrons através do sistema nitrogenase começa na proteína Fe e termina nos produtos reduzidos, contudo as etapas de transferência de elétrons entre os estágios inicial e final ainda não foram estabelecidas experimentalmente (KIM & REES, 1994).

Para o microrganismo fixar o dinitrogênio, o ambiente em que ele se encontra deve ser favorável, ou seja, este ambiente deve suprir nutrientes e condições necessárias para promover e suportar tanto a síntese quanto a atividade da nitrogenase. Os fatores essenciais para a fixação de nitrogênio são fontes de energia (ATP e elétrons), molibdênio, ferro, enxofre, baixas concentrações de oxigênio e hidrogênio no sítio da nitrogenase, ausência de nitrogênio fixado (NH_4^+) e temperatura apropriada (PEDROSA, 1988). O oxigênio é

nocivo a fixação de nitrogênio, causando inativação irreversível da proteína Fe e da proteína MoFe; inativação reversível por remoção dos doadores de elétrons para a nitrogenase (auto-redução das flavodoxinas e ferredoxinas) ou por indução de mudanças conformacionais na nitrogenase; e ainda a repressão de sua síntese (ROBSON & POSTGATE, 1980; GALLON, 1981).

Diazotrofos aeróbios precisam regular o fornecimento de oxigênio para produzir níveis adequados de ATP e por outro lado proteger a nitrogenase contra o dano pelo oxigênio (POSTGATE, 1982a; YATES, 1987; PEDROSA, 1988). Várias espécies de bactérias aeróbias se comportam como microaerófilos quando fixam nitrogênio. Aeróbios fixadores de nitrogênio bem adaptados como *Azotobacter* utilizam proteção respiratória e conformacional para proteger a nitrogenase do oxigênio (POSTGATE, 1982b). Outros utilizam a compartimentalização, como os heterocistos das cianobactérias ou nódulos microaerófilos de leguminosas (POSTGATE, 1982b; LOWE *et al.*, 1985).

1.1.1.1 Nitrogenases Alternativas

Azotobacter vinelandii possui duas nitrogenases alternativas em adição à convencional e os componentes destas nitrogenases alternativas tem sido purificados e parcialmente caracterizados (PAGE & COLLINSON, 1982; BISHOP *et al.*, 1986a; BISHOP *et al.*, 1986b; HALES *et al.*, 1986a; HALES *et al.*, 1986b; CHISNELL *et al.*, 1988). Uma das nitrogenases alternativas, a que contém vanádio, também foi encontrada em *Azotobacter chroococcum* (ROBSON *et al.*, 1986; EADY *et al.*, 1987). Os sistemas alternativos de fixação de nitrogênio foram identificados a partir de estirpes de *A. vinelandii* e *A. chroococcum* contendo deleções dos genes *nifHDK*. Estas estirpes não eram capazes

de crescimento diazotrófico na presença de molibdênio, mas eram capazes de crescer e possuíam atividade de nitrogenase na sua ausência (BISHOP *et al.*, 1986a; BISHOP *et al.*, 1986b; HALES *et al.*, 1986a; PAU *et al.*, 1989).

A principal diferença estrutural entre as três nitrogenases de *A. vinelandii* são os seus componentes metálicos. A nitrogenase clássica ou nitrogenase 1 contém molibdênio e ferro e é sintetizada quando o microrganismo é crescido em presença de Mo. A nitrogenase 2 contém vanádio e ferro, e é encontrada quando o microrganismo cresce na ausência de Mo, mas na presença de vanádio. A nitrogenase 3 é encontrada em células crescidas na ausência de Mo e V e parece conter apenas o Fe (DRUMMOND, 1996).

A expressão dos três sistemas de fixação de nitrogênio ou nitrogenases é reprimida por íons amônio e é regulada por molibdênio a nível de transcrição (JACOBSON *et al.*, 1986; DRUMMOND, 1996).

As proteínas das nitrogenases alternativas são estruturalmente similares às da nitrogenase convencional (EADY, 1991). Os dois sistemas alternativos são compostos de uma dinitrogenase redutase (proteína Fe) e uma dinitrogenase. As proteínas Fe do sistema 2 e 3 exibem um alto grau de similaridade com a proteína Fe do sistema convencional e ambas possuem núcleos Fe_4S_4 similares (PREMAKUMAR *et al.*, 1989; ROBSON *et al.*, 1989; BISHOP & JOERGER, 1990; JOERGER *et al.*, 1990). Ao contrário da dinitrogenase clássica, as dinitrogenases 2 e 3 são hexaméricas $\alpha_2\beta_2\delta_2$ (ROBSON *et al.*, 1989). Além disso, as dinitrogenases dos sistemas 2 e 3 possuem núcleos metálicos distintos do cofator FeMo: a dinitrogenase 2 ou proteína FeV possui um núcleo constituído de ferro, vanádio e enxofre, enquanto a dinitrogenase 3 não contém nem molibdênio nem vanádio, apenas ferro e enxofre. A troca de Mo por V ou por Fe nos diferentes tipos de nitrogenase indica que o molibdênio não é absolutamente necessário para dinitrogenase, mas estes metais não são

participantes inteiramente passivos no mecanismo de reação uma vez que as propriedades de redução de substrato das diferentes nitrogenases não são idênticas (ROBSON *et al.*, 1986; KIM & REES, 1994). Em contraste com a nitrogenase convencional, que reduz o acetileno a etileno, as nitrogenases alternativas reduzem o acetileno a uma mistura de etileno e etano, (DILWORTH *et al.*, 1987; DILWORTH *et al.*, 1988; SCHNEIDER *et al.*, 1991).

As nitrogenases alternativas também foram encontradas nas bactérias fototróficas *R. capsulatus* (SCHNEIDER *et al.*, 1991; MA *et al.*, 1994) e *Rhodospirillum rubrum* (LEHMAN & ROBERTS, 1991; DAVIS *et al.*, 1996).

1.1.2 Genética de Fixação de Nitrogênio

1.1.2.1 Genes *nif*

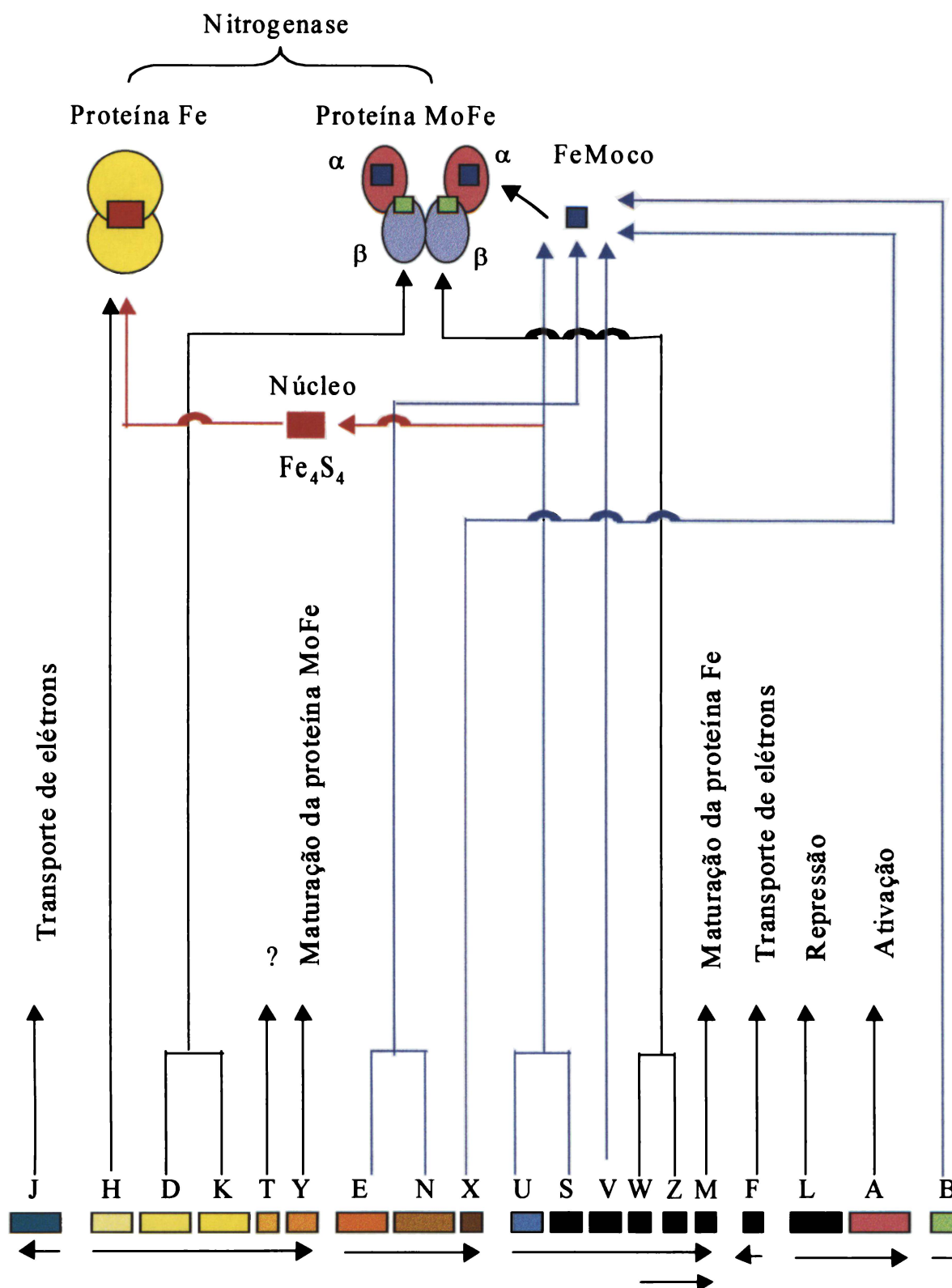
Os genes responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio são denominados de *nif* (POSTGATE, 1982b).

O microrganismo que tem sido melhor estudado é a *K. pneumoniae* e será usado como modelo para a descrição da organização estrutural e funcional dos genes *nif*. Neste microrganismo 20 genes são responsáveis pela capacidade de fixar nitrogênio, ocupando uma região de 25 kb do seu genoma e organizados em 8 unidades transcricionais ou operons (Figura 1) (MERRICK, 1982; MERRICK, 1992). O agrupamento de genes *nif* está localizado entre o operon *his* (operon para síntese de histidina) e *shiA* (gene relacionado com a captação de ácido shikímico) (POSTGATE, 1982a; POSTGATE, 1982b). Estudos comparativos de genes *nif* de diversos microrganismos, entre eles *A. vinelandii*, *A.*

chroococcum, *Rhodobacter capsulatus*, *E. agglomerans* e *K. pneumoniae* sugerem que existam pelo menos 14 genes *nif* comuns a todos os diazotrofos: os genes *nifH*, *D*, *K*, *E*, *N*, *X*, *U*, *S*, *V*, *Z*, *W*, *M*, *B*, *Q*, cujos produtos provavelmente são essenciais para a biossíntese da nitrogenase (MERRICK, 1982).

A hipótese da existência de genes homólogos aos *nif* em outras regiões do genoma foi levantada, uma vez que mutações em vários destes genes não eliminaram completamente a atividade de nitrogenase (MERRICK, 1992). Estes genes homólogos provavelmente codificariam proteínas com funções relacionadas que poderiam substituir, embora parcialmente, os produtos dos genes *nif*. Por exemplo, um gene homólogo ao *nifM* foi identificado na região a montante do operon *pdxA* em *E. coli*, e um outro, homólogo ao *nifS*, em *Saccharomyces cerevisiae* (MERRICK, 1982; ROA *et al.*, 1989; OLIVER *et al.*, 1992).

Os genes estruturais da nitrogenase são os genes *nifHDK*, onde *nifH* codifica as subunidades γ da proteína Fe e *nifDK* codificam as subunidades α e β da proteína MoFe (SUNDARESAN & AUSUBEL, 1981; HOLLAND *et al.*, 1987; IOANNIDIS & BUCK, 1987). Os genes *nifHDK* foram sequenciados e caracterizados em uma variedade de organismos fixadores de nitrogênio (HOWARD & RESS, 1994). De modo geral, as propriedades estruturais e funcionais de seus produtos são altamente conservadas em diferentes organismos (EMERICH & BURRIS, 1976).

FIGURA 1. Organização estrutural dos genes *nif* em *K. pneumoniae*

Mutantes *nifM* de *K. pneumoniae* produzem proteína Fe inativa, sugerindo que a proteína NifM seja importante no processo de maturação desta enzima (ROBERTS *et al.*, 1978). Experimentos utilizando *E. coli* como hospedeiro demonstraram que apenas os produtos dos genes *nifA*, *nifH* e *nifM* são necessários para a síntese da proteína Fe ativa (HOWARD *et al.*, 1986; PAUL & MERRICK, 1988; PAUL & MERRICK, 1989). A função do produto do gene *nifM* ainda não é conhecida, mas os autores sugerem que a proteína NifM permitiria que a aponitrogenase redutase adquirisse uma conformação apropriada para a captação do grupo Fe_4S_4 , promovendo a inserção pós-traducional do grupo FeS ou ainda poderia ser necessária para o posicionamento apropriado das subunidades da proteína Fe para receber o grupo Fe_4S_4 (HOWARD *et al.*, 1986; HOWARD *et al.*, 1989; GEORGIARDIS *et al.*, 1992). É possível que outros genes cromossomais também sejam requeridos para produção da proteína Fe madura, como por exemplo, os genes envolvidos na captação de Fe e em sistemas produtores de sulfato, que são normalmente utilizados na síntese de proteínas FeS (HOWARD *et al.*, 1986). Roberts *et al.* (1978) e Jacobson *et al.* (1989b) mostraram que mutantes *nifUS* de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* apresentaram níveis muito baixos de atividade de dinitrogenase redutase. Estes resultados aparentemente contradizem os resultados obtidos por Paul & Merrick (1988, 1989) e Howard *et al.* (1986). Uma possível explicação seria a presença de alguma proteína em *E. coli* que pudesse substituir os produtos dos genes *nifUS* (JACOBSON *et al.*, 1989b). Os produtos dos genes *nifUS* aparentemente estão envolvidos na captação e mobilização de Fe e S necessários para a formação do núcleo Fe_4S_4 da proteína Fe em estirpes de *A. vinelandii* e *K. pneumoniae*, uma vez que a deleção dos genes *nifUS* resulta no acúmulo de proteína Fe inativa (ROBERTS *et al.*, 1978; JACOBSON *et al.*, 1989b; MILLER & ORME-JOHNSON, 1992). A proteína NifS é um homodímero contendo piridoxal fosfato e

seu papel na mobilização do enxofre para a formação do grupo FeS foi recentemente estabelecido através de sua purificação e caracterização (ZHENG *et al.*, 1993). Uma vez que a proteína NifS catalisa a dessulfurização da L-cisteína, é possível que o produto do gene *nifS* ative o enxofre através da formação do complexo enzima-persulfeto, que serviria como doador de enxofre na formação do grupo FeS da nitrogenase (DEAN *et al.*, 1993; ZHENG *et al.*, 1993; ZHENG *et al.*, 1994).

Recentemente o produto do gene *nifU* foi purificado e se demonstrou que este é um homodímero e que provavelmente contenha um grupo Fe₂S₂ redox ativo por subunidade. Esta proteína poderia doar o grupo Fe₂S₂ para as formas imaturas de proteína Fe ou proteína MoFe ou poderia ser a responsável pela manutenção do ferro em um estado apropriado de oxidação e disponível para ligação com o grupo FeS ou ainda poderia interagir com a proteína NifS para a liberação do enxofre (DEAN *et al.*, 1993).

Estudos genéticos e bioquímicos identificaram as proteínas necessárias para a síntese do cofator FeMo: os produtos dos genes *nifH*, *nifE*, *nifN*, *nifB*, *nifV* e *nifQ*. Na ausência dos genes *nifH*, *nifE*, *nifN* e *nifB* apenas uma apoproteína MoFe é sintetizada, sugerindo que estes genes são imprescindíveis para síntese do cofator (DEAN *et al.*, 1993).

A função da proteína NifH na síntese do cofator FeMo é independente de sua atividade de nitrogenase redutase, uma vez que mutantes *nifM* em *K. pneumoniae* (incapazes de sintetizar a proteína Fe ativa) e mutantes de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* com deleção parcial do gene *nifH* (produzem proteína Fe incapaz de transferir elétrons) ainda sintetizam cofator FeMo ativo (ROBINSON *et al.*, 1987; FILLER *et al.*, 1986).

Os produtos dos genes *nifEN* apresentam homologia com aqueles dos genes *nifDK* (AGUILAR *et al.*, 1987; BRIGLE *et al.*, 1987; ARNOLD *et al.*, 1988). Esta evidência junto com a necessidade dos produtos dos genes *nifEN* para a biossíntese do cofator FeMo levou

à sugestão de que o cofator FeMo não seria sintetizado diretamente sobre a apoproteína MoFe, mas em um complexo proteico formado por NifE e NifN, que funcionaria como um suporte para a síntese do cofator (DEAN *et al.*, 1993). Os produtos dos genes *nifEN* formam um heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$ com massa molecular de aproximadamente 200 kDa, podendo ser inativado pelo oxigênio devido a oxidação do grupo FeS presente no seu interior (PAUSTIAN *et al.*, 1989). Recentemente o papel de NifNE na síntese do cofator FeMo foi reforçado pelos resultados de Roll *et al.* (1995) que mostraram o acúmulo de diferentes precursores de cofator neste complexo proteico. *A. vinelandii* apresenta uma segunda cópia dos genes *nifENX*, que podem participar no processamento da nitrogenase-2 e nitrogenase-3 (MERRICK, 1992).

Mutantes *nifV* de *K. pneumoniae* produzem proteína MoFe com propriedades alteradas de redução de substrato, e o mesmo ocorre quando uma apoproteína MoFe extraído de mutante *nifB* é reconstituída por um cofator obtido de um mutante *nifV* (HAWKES *et al.*, 1984a). O produto do gene *nifV* é requerido para a formação do homocitrato, o constituinte orgânico do cofator FeMo (HOOVER *et al.*, 1989). A análise da sequência de vários produtos de genes *nifV* revelou que a proteína NifV provavelmente é uma homocitrato sintase e catalisa a condensação de 2-oxoglutarato e acetil-CoA (WANG *et al.*, 1991; MEIJER & TABITA, 1992). A incorporação de homocitrato ao cofator FeMo lhe confere características de especificidade (HOOVER *et al.*, 1988; SHAH *et al.*, 1988).

O produto do gene *nifQ* participa da mobilização de Mo, necessário para biossíntese do cofator FeMo. A análise da sequência de aminoácidos das proteínas NifQ de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* revelou um grupo de resíduos de cisteínas na porção C-terminal, sugerindo um sítio de ligação para metal (JOERGER & BISHOP, 1988). O fenótipo NifQ pode ser suprimido por um aumento na concentração de Mo ao meio de

cultura (UGALDE *et al.*, 1985) ou pela presença de cisteína, fonte de enxofre para a biossíntese do grupo FeS, indicando que a proteína NifQ possa auxiliar na formação da unidade MoFe_3S_3 do cofator FeMo (DEAN *et al.*, 1993). A produção da proteína NifQ em pequena quantidade pela célula sugere que é uma proteína eficiente no transporte e processamento de Mo (RODRIGUEZ-QUINONES *et al.*, 1993).

A proteína NifB apresenta um grupo de resíduos altamente conservados e semelhantes àqueles encontrados em proteínas que se ligam a grupos FeS, como as ferredoxinas (BUIKEMA *et al.*, 1987; JOERGER & BISHOP, 1988). O produto do gene *nifB* poderia ter um papel complementar na formação da unidade Fe_4S_3 do cofator FeMo. Não se conhece um pré-agrupamento de unidades de cofator FeMo nos produtos dos genes *nifB* e *nifQ*, mas a formação de precursores do cofator FeMo nestas proteínas é sustentada pelo arranjo dos resíduos de suas sequências de aminoácidos, capazes de coordenar grupos metálicos e que, posteriormente, seriam transferidos para o complexo formado pelo produto dos genes *nifEN* (DEAN *et al.*, 1993).

O papel central ocupado pelo gene *nifB* na biossíntese de cofator FeMo é suportado pelo seu alto grau de conservação em uma variedade de diferentes organismos, entre eles *K. pneumoniae* (BUIKEMA *et al.*, 1987), *R. meliloti* (BUIKEMA *et al.*, 1987), *A. vinelandii* (JOERGER & BISHOP, 1988), *Frankia* (HARRIOT *et al.*, 1995), *R. capsulatus* (KLIPP *et al.*, 1988; MASEPOHL *et al.*, 1988; MORENO-VIVIAN *et al.*, 1989), *R. leguminosarium* (ROSSEN *et al.*, 1984; BUIKEMA *et al.*, 1987; GRÖNGER *et al.*, 1987), *R. japonicum* (FUHRMANN *et al.*, 1985), *Enterobacter agglomerans* (SIDDAVATTAM *et al.*, 1995) e *H. seropedicae* (SOUZA *et al.*, 1991b).

A proteína NifB tem massa molecular de aproximadamente 55 kDa (HARRIOT *et al.*, 1995), e possui um domínio N-terminal muito conservado em relação ao C-terminal

(SIDDAVATTAM *et al.*, 1995). Esta proteína apresenta uma região rica em cisteínas conservadas que caracterizam um motivo de ligação para metais (Cys-X₃-Cys-X₂-Cys-X₅-Cys), semelhante ao dos grupos [4Fe-4S] encontrados em ferredoxinas (BUIKEMA *et al.*, 1987). A porção C-terminal de NifB em *E. agglomerans*, *K. pneumoniae*, *R. meliloti* e *R. leguminosarium* apresenta um motivo conservado (VA-X₁₁-HFG-X₇-Y-X₅-G) que é encontrado nas proteínas NifX e NifY de *K. pneumoniae* e *R. meliloti* (MASEPOHL *et al.*, 1988; MORENO-VIVIAN *et al.*, 1989; SIDDAVATTAM *et al.*, 1995).

O papel do produto do gene *nifB* na síntese de cofator FeMo não era conhecido até pouco tempo, mas recentemente foi isolado uma pequena molécula contendo Fe e S, um provável precursor de cofator FeMo, associado a NifB. Nesta forma NifB passa a ser denominado de NifB-co (SHAH *et al.*, 1994). Tem sido sugerido que NifB-co possa ser sintetizado por enzimas como NifS (ZHENG *et al.*, 1993) e rodanase (PAGANI *et al.*, 1987; PAGANI *et al.*, 1991), que aparentemente estariam envolvidas na mobilização de Fe e S requeridos para a formação de grupos metálicos. O possível envolvimento de NifU também tem sido reportado (DEAN *et al.*, 1993). NifB-co tem sido considerado uma fonte potencial de Fe e S para a biosíntese do cofator FeMo porque em ensaios *in vitro* a quantidade de cofator FeMo sintetizado é proporcional a quantidade de NifB-co adicionado ao sistema. Além disso, NifB-co pode associar-se com outras proteínas que participam da biossíntese do cofator FeMo, tais como proteína γ e NifNE e ainda a proteínas desconhecidas (ALLEN *et al.*, 1995). NifB também é necessário para síntese dos cofatores FeV e FeFe das nitrogenases alternativas (SHAH *et al.*, 1994).

Já foi demonstrado que o produto do gene *nifY* pode ser encontrado ligado a apoproteína MoFe em certos mutantes de *K. pneumoniae*, em uma proporção de 2:1 (NifY:apo proteína MoFe) (HAWKES & SMITH, 1984a; WHITE *et al.*, 1992; HOMER *et*

al., 1993). Porém, este complexo é desfeito na presença de cofator FeMo, sugerindo que a proteína NifY poderia funcionar como um suporte molecular, estabilizando a conformação da apoproteína MoFe e tornando-a receptiva à inserção de cofator FeMo (WHITE *et al.*, 1992; HOMER *et al.*, 1993). A demonstração de que a apoproteína MoFe é menos estável em mutantes *nifY* reforça a hipótese do papel do produto deste gene (HOMER *et al.*, 1993).

Roberts *et al.* (1978) sugeriram o envolvimento dos produtos dos genes *nifF* e *nifJ* no transporte de elétrons, o que foi reforçado por Hill & Kavanagh (1980) ao observarem que o piruvato só poderia atuar como doador de elétrons para nitrogenase em estirpes selvagens de *K. pneumoniae*, mas não em mutantes *nifF* e *nifJ*. De fato, o produto do gene *nifJ* é uma piruvato flavodoxina oxirredutase e o produto do gene *nifF*, uma flavodoxina, e ambos participam da transferência de elétrons do piruvato para a proteína Fe (HILL & KAVANAGH, 1980; DEISTUNG *et al.*, 1985; SHAH *et al.*, 1983).

A proteína NifX aparentemente está envolvida na regulação negativa da transcrição de genes *nif* em resposta a flutuações dos níveis de íons amônio e oxigênio, uma vez que mutantes *nifX* de *K. pneumoniae* apresentam acúmulo da proteína MoFe e sua superexpressão bloqueia a transcrição do operon *nifHDKTY*. Outro fato importante é que a análise da sequência de aminoácidos codificada pelo gene *nifX* apresenta regiões homólogas aos genes *nifA* e *nifB* de *K. pneumoniae* (GOSINK *et al.*, 1990).

Os genes *nifW* e *nifZ* aparentemente não são essenciais para a fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae*, uma vez que mutações nestes genes causam apenas uma desrepressão mais lenta da atividade da nitrogenase, sugerindo que a função do produto destes genes poderia ser parcialmente substituída por outras proteínas (PAUL & MERRICK, 1989). Porém, em *A. vinelandii* a mutação dos genes *nifWZ* resultou em um crescimento

diazotrófico mais lento e na perda da estabilidade da proteína MoFe, sugerindo o envolvimento destes genes no processamento e estabilidade da proteína MoFe neste microrganismo (JACOBSON *et al.*, 1989b).

Ainda não se conhece a função do gene *nifT* na fixação de nitrogênio (HOMER *et al.*, 1993). Os produtos dos genes *nifLA* são proteínas regulatórias da expressão dos genes *nif* em *K. pneumoniae*, ou seja, controlam a transcrição dos outros genes *nif*. Enquanto o produto do gene *nifA* ativa a transcrição dos genes *nif*, o de *nifL* reprime (MERRICK, 1983).

As sequências dos produtos dos genes *vnfDK* e *anfDK*, que codificam as subunidades da proteína VFe e da proteína FeFe, respectivamente, apresentam considerável similaridade com a dos genes *nifDK* (EADY, 1991), em particular os resíduos que ligam os centros metálicos a estas proteínas são conservados. O operon codificador dos genes estruturais das nitrogenases alternativas apresentou um pequeno gene adicional, *vnfG* e *anfG*, entre os genes *vnfD*, *vnfK* e *anfD*, *anfK*, que não está presente entre *nifD* e *nifK* (KIM & REES, 1994). Os genes *vnfG* e *anfG* codificam para a subunidade δ das proteínas VFe e FeFe (KIM & REES, 1994).

Alguns genes *nif* parecem ser necessários para todos os sistemas de fixação de nitrogênio, o convencional e os alternativos. Evidências do envolvimento do produto do gene *nifM*, necessário para o processamento do produto do gene *nifH* em *K. pneumoniae* (HOWARD *et al.*, 1986; JACOBSON *et al.*, 1989b) nos sistemas alternativos e convencional, foram apresentados por Kennedy *et al.* (1986). Experimentos de complementação bioquímica com as estirpes Ca-30 mutantes (*nifB*::Tn5) e UN-45 (*nif*-45) de *A. vinelandii* (*nifB*⁻) contendo o gene *nifB* de *K. pneumoniae*, mostraram que estas estirpes passam a fixar nitrogênio tanto em presença de Mo ou V, indicando o envolvimento

do produto do gene *nifB* nos sistemas alternativos e convencional de fixação de nitrogênio (SHAH *et al.*, 1986). Recentemente também foi demonstrado que a expressão do promotor do gene *nifB* de *A. vinelandii* pode ser ativada pelos ativadores transcricionais análogos a proteína NifA (nitrogenase convencional), a VnfA (nitrogenase 2) e a AnfA (nitrogenase 3) (DRUMMOND, 1996).

1.1.2.2 Genes *fix*

Os genes *fix* foram inicialmente identificados em mutantes de rizóbio deficientes na fixação de nitrogênio. Apesar de envolvidos na fixação de nitrogênio, estes genes não são homólogos aos genes *nif* de *K. pneumoniae*, mas posteriormente foram encontrados em outros organismos, inclusive em não diazotrofos, sugerindo que estes genes podem não estar envolvidos especificamente com a fixação de nitrogênio. Os genes *fix* identificados são *fixR*, *fixABCX*, *fixGHIS*, *fixK*, *fixLJ*, *fixNOPQ*, e *fixW* (MERRICK, 1992; FISCHER, 1994).

Os produtos dos genes *fixBC* também estão presentes em *A. vinelandii*, *A. brasilense* e *E. coli* e parecem estar envolvidos no transporte de elétrons para a nitrogenase (MERRICK, 1992). A análise de sequência de aminoácidos deduzida dos genes *fixNOQP* de *B. japonicum*, sugere que estas proteínas compõem um complexo oxidase de alta afinidade necessário para manter a respiração bacteriana nas condições de baixo nível de oxigênio dos nódulos de raízes (PREISIG *et al.*, 1993). Os genes *fixGHIS* codificam para proteínas transmembrana: FixI formaria uma bomba de cátions que funcionaria acoplada às reações redox catalisada pela subunidade FixG (KAHN *et al.*, 1989). A função dos produtos dos genes *fixGHIS* em rizóbios fixadores de nitrogênio ainda precisa ser elucidada

(FISCHER, 1994). O produto do gene *fixR* de *B. japonicum* parece estar envolvido na ativação e inativação da proteína NifA por oxigênio (BAKER, 1992; FISCHER, 1994). As proteínas FixL e FixJ são membros do sistema regulatório de dois componentes, capacitando a bactéria responder ao ambiente ou a sinais citoplasmáticos com atividades celulares específicas (ALBRIGHT *et al.*, 1989). A proteína FixK pertence a uma família de reguladores transcricionais de procariotos, sendo necessária para a regulação positiva ou negativa de promotores *nif* e *fix* em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (BATUT *et al.*, 1989; FISCHER, 1994).

1.1.3 Síntese do Cofator FeMo

A síntese de cofator FeMo *in vitro* requer molibdato, ATP, os produtos dos genes *nifB*, *nifN* e *nifE* (SHAH *et al.*, 1986), *nifH* (SHAH *et al.*, 1988; ALLEN *et al.*, 1993) e ácido homocítrico (HOOVER *et al.*, 1987).

A apodinitrogenase purificada de mutantes *nifB* de *A. vinelandii* ou de *K. pneumoniae* apresenta-se associada a uma proteína de 20 kDa, formando um complexo $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ (HAWKES & SMITH, 1983; PAUSTIAN *et al.*, 1990). Esta proteína γ é essencial para a biossíntese e inserção do cofator FeMo (ALLEN *et al.*, 1993). A apodinitrogenase de mutantes *nifH* não está associada a proteína γ (TAL *et al.*, 1991), mas o complexo $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ pode ser formado por complementação bioquímica com dinitrogenase redutase e ATP (ALLEN *et al.*, 1993).

A proteína γ de *A. vinelandii* aparentemente interage com a apodinitrogenase e com cofator FeMo (HOMER *et al.*, 1995), possivelmente causando uma alteração conformacional na apodinitrogenase que tornaria mais acessível o sítio de ligação para

cofator FeMo (HOMER *et al.*, 1995). As etapas envolvidas neste processo ainda não estão totalmente esclarecidas. Duas hipóteses foram sugeridas: a) a proteína γ ligada ao cofator FeMo teria maior afinidade pela apodinitrogenase, deslocando as proteínas γ já associadas; ou b) a apodinitrogenase associada a proteína γ teria mais afinidade pelo cofator FeMo, que então se associaria ao hexâmero $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ (HOMER *et al.*, 1995). Aparentemente a proteína γ tem propriedades de uma chaperona, podendo ser uma proteína processadora de proteínas metálicas em geral. O gene que a codifica ainda não foi identificado, mas sabe-se que não se trata de um gene *nif* (HOMER *et al.*, 1995; LUDDEN *et al.*, 1997).

O mecanismo proposto para a biossíntese do cofator FeMo envolve em uma primeira etapa onde o produto do gene *nifB* se torna ativado na forma de NifB-co, pela ação de NifU e NifS (DEAN *et al.*, 1993). Posteriormente ocorreria a interação entre NifB-co, NifNE (ALLEN *et al.*, 1995; ROLL *et al.*, 1995) e uma proteína ácida desconhecida (LUDDEN *et al.*, 1997) e, finalmente, o cofator FeMo se acumularia na proteína γ , em um processo envolvendo a dinitrogenase redutase, (ALLEN *et al.*, 1995; LUDDEN *et al.*, 1997) antes de ser incorporado na dinitrogenase.

1.1.4 Regulação da Fixação de Nitrogênio

O processo de fixação de nitrogênio é energeticamente muito caro, devido ao alto consumo de ATP e elétrons por molécula de dinitrogênio reduzido (SIMPSON & BURRIS, 1984). Desta forma este processo é estritamente regulado, tanto a nível de expressão como a nível de atividade da nitrogenase.

1.1.4.1 Regulação da Expressão dos Genes *nif*

K. pneumoniae é o microrganismo que melhor tem sido estudado com relação ao mecanismo de regulação do processo de fixação de nitrogênio. Neste organismo a expressão dos genes *nif* é regulada em dois níveis: pelo sistema de regulação geral do nitrogênio (*ntr*) e por proteínas ativadoras e repressoras *nif* específicas, produto dos genes *nifL* e *nifA*, em resposta aos níveis de íons amônio, aminoácidos ou outras substâncias nitrogenadas, oxigênio e fontes energéticas (POSTGATE, 1982a).

Os genes *nif* apresentam promotores RpoN-dependentes, ou seja, são reconhecidos pelo fator σ^N , que é uma subunidade sigma alternativa da RNA polimerase (MERRICK, 1992). A subunidade σ^N (RpoN, NtrA, sigma-54), codificada pelo gene *rpoN* (*glnF* ou *ntrA*) participa do reconhecimento de várias sequências promotoras pela RNA polimerase (LONETTO *et al.*, 1992; FISCHER, 1994). Duas funções principais são atribuídas ao fator σ^N : reconhecer e ligar ao DNA e interagir com a RNA polimerase (CANNON *et al.*, 1994).

O número de resíduos de aminoácidos que compõem a RpoN em diferentes organismos varia entre 426 e 526, que se distribuem em três diferentes domínios denominados I, II e III (FISCHER, 1994). O domínio I, N-terminal, é conservado, rico em leucina e glutamina e é responsável pela ligação ao DNA, além de auxiliar no desenrolamento do DNA no local do promotor (FISCHER, 1994; CANNON *et al.*, 1995b). O domínio II apresenta um tamanho variado, é pouco conservado mas apresenta uma alta proporção de resíduos ácidos e poderia ser responsável por uma mudança conformacional levando a fusão do complexo transcricional fechado (WONG & GRALLA, 1992; FISCHER, 1994). Recentemente, foi demonstrado que esta região é essencial para a ligação à RNA polimerase (TINTUT *et al.*, 1994). O domínio C-terminal (III) é bem conservado,

apresentando dois motivos característicos na porção distal: o motivo hélice-volta-hélice, que pode estar envolvido na interação com a região promotora -24/-12, e 10 aminoácidos estritamente conservados. Sua função ainda não é conhecida e é designado de RpoN-box (van SLOOTEN *et al.*, 1990; MERRICK & CHAMBERS, 1992). Um modelo que descreve a interação do fator σ^N , RNA polimerase e regiões do DNA, foi proposto. Neste modelo o fator σ^N formaria um complexo com a enzima, que seria capaz de se ligar ao DNA e iniciar a síntese de RNA. Durante ou após a iniciação, o fator σ^N seria liberado do complexo, tornando-se disponível para interagir com outras moléculas de RNA polimerase (TRAVERS & BURGESS, 1969).

Através de sequenciamento de DNA foi verificado que a região a jusante à região codificadora da RpoN é bem conservada. Os autores sugerem que estes genes poderiam ser sensíveis ao estado nutricional da bactéria e regular a atividade do fator σ^N por fosforilação (IMAISHI *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1994).

A região promotora dos genes RpoN-dependentes apresentam uma sequência consenso conservada (5'-TGGCAC-N₅-TTGCA/T-3') localizada entre as posições -26 e -11 (posições relativas ao início de transcrição) (MORETT & BUCK, 1989). A designação promotor -24/-12 se deve aos nucleotídeos GG e GC altamente conservados nas posições -25/-24 e -13/-12, respectivamente (FISCHER, 1994). Em contraste com a RNA polimerase contendo o fator σ^{70} , a holoenzima contendo σ^N é incapaz de iniciar a transcrição por si só, requerendo a presença de um ativador transcricional que catalise a isomerização do complexo fechado para complexo aberto (POPHAM *et al.*, 1989; FISCHER, 1994). Consequentemente, a expressão de genes RpoN-dependentes está sempre sujeita a um controle positivo por uma proteína ativadora, cuja atividade é modulada em resposta a sinais fisiológicos específicos (KUSTU *et al.*, 1989). As proteínas NifA e NtrC

representam reguladores transcricionais relevantes para a expressão dos genes σ^N -dependentes envolvidos no processo de fixação de nitrogênio (FISCHER, 1994), e ligam-se à uma sequência específica de nucleotídeos da região promotora, localizada a cerca de 100 pares de base acima do promotor consenso -24/-12. Esta região é denominada sequência ativadora a montante (“upstream activator sequence”, UAS) (MERRICK, 1992).

O ativador requerido pelos promotores dos genes *nif* é o produto do gene *nifA* (proteína NifA), que se liga à sequência consenso TGT-N₁₀-ACA (OW & AUSUBEL *et al.*, 1983).

1.1.4.1.1 Regulação dos Genes *nif* através de Proteínas NifA e NifL

Uma vez que na maioria dos casos a expressão do gene *rpoN* é constitutiva, o principal controle da expressão dos genes *nif* é realizado pela regulação da expressão e da atividade da proteína NifA. Neste processo estão envolvidos principalmente três fatores: o nível de oxigênio, de nitrogênio fixado e a disponibilidade de metais no meio (MERRICK, 1992). Em *K. pneumoniae*, *A. chroococcum*, *E. agglomerans* e *A. vinelandii*, a proteína NifL modula a atividade da proteína NifA em resposta aos níveis de oxigênio e íons amônio (DIXON *et al.*, 1980; HILL *et al.*, 1981; MERRICK *et al.*, 1982; SIBOLD *et al.*, 1982). Em outros organismos, tais como rizóbios, *H. seropedicae* e *A. brasilense*, a atividade da proteína NifA é inibida diretamente pelos níveis de oxigênio, que provavelmente são monitorados através de um motivo específico (Cys-X₄-Cys) (MERRICK, 1992). Em *R. capsulatus*, *H. seropedicae* e *A. brasilense* a atividade da proteína NifA é controlada pelos níveis de íons amônio (MASEPOHL *et al.*, 1988; SOUZA *et al.*, 1995b; ARSENE *et al.*, 1996). Em *A. brasilense* o controle da atividade da proteína NifA aparentemente é mediado

pela proteína PII (ARSENE *et al.*, 1996). Em *H. seropedicae* e *A. brasilense* a modulação da atividade da proteína NifA em resposta às mudanças dos níveis de íons amônio ocorre através do domínio N-terminal da própria proteína NifA (SOUZA *et al.*, 1995b; ARSENE *et al.*, 1996).

A proteína NifA é um membro da família de ativadores de promotores σ^N -dependentes. Em *K. pneumoniae*, possui massa molecular de aproximadamente de 58 kDa e está organizada em três domínios funcionais (DRUMMOND *et al.*, 1986; ARNOLD *et al.*, 1988). O domínio N-terminal da proteína NifA varia de 175 a 225 aminoácidos, podendo estar ausente como em *Rhizobium trifolii* (MERRICK, 1992; FISCHER, 1994). Por analogia com outras proteínas ativadoras σ^N -dependentes, como NtrC, foi sugerido o envolvimento desta região na modulação da atividade de NifA por interação com fatores que sinalizam mudanças ocorridas no meio (DRUMMOND *et al.*, 1990; MERRICK, 1992). O domínio central consiste de cerca de 240 aminoácidos e, ao contrário do N-terminal, apresenta alto grau de conservação de sua sequência entre os diazotrofos. Esta região apresenta um motivo característico de ligação de ATP e catalisa a hidrólise de ATP na passagem para o complexo aberto (DRUMMOND *et al.*, 1990; CANNON & BUCK, 1992). Ensaio *in vitro* demonstraram que a atividade do domínio central da proteína NifA de *K. pneumoniae* é inibida por NifL e sugerem que NifL interfere com o contato entre NifA e RNA polimerase (BERGER *et al.*, 1994). O domínio C-terminal apresenta um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado capaz de ligar o DNA (FISHER, 1994).

A proteína NifL é um inibidor da proteína NifA: em condições de alto níveis de íons amônio e oxigênio NifL inibe NifA, aparentemente por complexação. A proteína NifL apresenta uma sequência de aminoácidos com baixa homologia com outras proteínas regulatórias e uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa. Esta proteína apresenta

dois domínios e foi sugerido que a região N-terminal poderia estar envolvida na sensibilidade da proteína ao oxigênio por conter uma sequência Cys¹⁸⁴-Ala-Asp-Cys¹⁸⁷ que seria um potencial sítio sensível a oxido-redução (DRUMMOND & WOOTTON, 1987). Estudos recentes, mostraram que a região N-terminal realmente está envolvida no sensoriamento do estado redox da célula, além de ser capaz de ligar-se a ADP, sugerindo que a atividade de NifL possa estar regulada pelo nível energético da célula (HILL *et al.*, 1996). A região C-terminal está envolvida no sensoriamento de nitrogênio fixado. He *et al.* (1997) sugerem que esta atividade de NifL é mediada pelo produto do gene *glnK*. Aparentemente NifL interage com NifA através do seu domínio N-terminal, o qual seria suficiente para inibir a atividade de NifA (NARBERHAUS *et al.*, 1995).

A expressão dos genes reguladores também está sob controle das condições ambientais de nitrogênio fixado e oxigênio nos diferentes diazotrofos. Em *K. pneumoniae* a regulação da expressão do gene *nifA* por íons amônio é mediada pelo sistema *ntr*, onde os níveis de íons amônio são percebidos pela uridililtransferase/enzima removedora de uridilil (produto do gene *glnD*) e transmitidos via PII (produto do gene *glnB*) para a proteína NtrB. Em condições limitantes de nitrogênio NtrB fosforila NtrC, ativando a transcrição do operon *nifLA* (DRUMMOND *et al.*, 1983; OW & AUSUBEL, 1983; MERRICK, 1992). Já o controle da expressão do gene *nifA* pelo oxigênio ocorre através do estado de superenrolamento do promotor *nifLA*, que é afetado pelos níveis de oxigênio (DIXON *et al.*, 1988; WHITEHALL *et al.*, 1992).

O modelo que representa o mecanismo de ativação de promotores σ^N -dependente pela proteína NifA é universal e descreve, além da ativação mediada por NifA de promotores *nif* em *K. pneumoniae*, *Rizobia* e outros diazotrofos, a ativação de outras proteínas ativadoras que interagem com RNA polimerase- σ^N (KUSTU *et al.*, 1989;

THÖNY & HENNECKE, 1989; MERRICK, 1992). A proteína NifA se liga a UAS que, em geral está localizada a cerca de 80-150 nucleotídeos a montante do promotor -24/-12 enquanto que RNA polimerase- σ^N ligam-se a sequência promotora (BUCK *et al.*, 1987). A interação entre NifA e RNA polimerase- σ^N é facilitada pelo dobramento do DNA. Em vários promotores *nif* este dobramento é induzido por uma pequena proteína denominada fator de integração do hospedeiro ou IHF ("Integration Host Factor"), que se liga entre a UAS da proteína NifA e a região -24/-12 de vários promotores *nif*. Este mecanismo foi originalmente demonstrado para o promotor *nifH* em *K. pneumoniae* (SANTERO *et al.*, 1992).

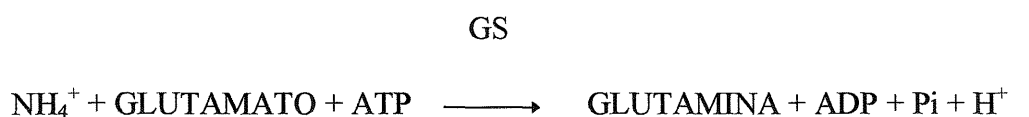
Em *K. pneumoniae* a transcrição do operon *nifHDKTY* além de sofrer regulação pelos produtos dos genes *nifLA*, sofre regulação negativa pelo produto do gene *nifX* em resposta aos níveis intracelulares de íons amônio e oxigênio. Contudo, este mecanismo de regulação ainda não foi esclarecido (GOSINK *et al.*, 1990).

1.1.4.1.2 Regulação da Expressão dos Genes *nif* pelo Sistema *ntr*

Embora os íons amônio seja a fonte de nitrogênio preferida para o crescimento bacteriano, as bactérias frequentemente utilizam uma grande variedade de fontes nitrogenadas alternativas tais como nitrato, aminoácidos, nucleotídeos ou nitrogênio molecular. A viabilização da utilização destas fontes alternativas de nitrogênio ocorre através da síntese de várias proteínas que promovem a captação e a metabolização destes compostos nitrogenados. A expressão destas vias metabólicas está sob controle do sistema de regulação geral do nitrogênio (*ntr*). O sistema *ntr* envolve seis proteínas que são

produtos dos genes *glnA*, *glnD*, *glnB*, *glnK*, *ntrB* e *ntrC*, os quais interagem em um complexo mecanismo em cascata (MERRICK & EDWARDS, 1995).

A glutamina sintetase (GS) é uma proteína multimérica, constituída de 12 subunidades idênticas de massa molecular de aproximadamente 52 kDa (LEO & MAGASANIK, 1975). Esta enzima juntamente com a glutamato sintase (GOGAT) está envolvida na assimilação de nitrogênio (PAHEL *et al.*, 1982). A glutamato sintase apresenta duas subunidades não idênticas de massa molecular aproximado de 188 kDa, que são codificadas pelos genes *gltBD* (MERRICK & EDWARDS, 1995). A GS e GOGAT catalizam as seguintes reações:



Em bactérias entéricas, *glnA* faz parte do operon *glnAntrBC*. Nestes organismos o gene *glnA* é expresso por dois promotores, *glnAp1* e *glnAp2*, enquanto que os genes *ntrBC* podem ser cotranscritos com *glnA* a partir de seus dois promotores ou expressos separadamente, a partir do promotor *pntrBC*, situado entre *glnA* e *ntrB* (UENO-NISHIO *et*

al., 1983; MacFARLANE & MERRICK, 1985; REITZER & MAGASANIK, 1985; DIXON, 1984). Em presença de íons amônio *glnA* é expresso a partir do promotor *glnAp1* (do tipo σ^{70}), enquanto a expressão de *ntrBC* ocorre primariamente através do promotor *pntrBC*. Em condições limitantes de nitrogênio, a proteína NtrC ativa o promotor *glnAp2* (tipo -24/-12) e reprime os promotores σ^{70} (*glnAp1* e *pntrB*), que são sobrepostos por um sítio de ligação de NtrC (REITZER & MAGASANIK, 1985; MAGASANIK, 1989; MERRICK & EDWARDS, 1995). Em *E. coli*, a organização do operon *glnAntrBC* permite um baixo nível de transcritos *glnA* e *ntrBC* em presença de íons amônio, resultando em uma concentração estimada de 5 moléculas do dímero NtrC por célula. Em condições limitantes de íons amônio ocorre um aumento de até 14 vezes no número de transcritos *ntrBC*, isto porque o nível de transcrição pelo promotor σ^N -dependente é muito maior do que a do *glnAp1* (REITZER & MAGASANIK, 1983). Em resposta ao aumento de nitrogênio celular a atividade de GS também é progressivamente reduzida através de sua adenililação, processo que consiste na adição covalente de um grupo AMP ao resíduo de tirosina 51 em cada uma das subunidades de GS. Já em baixos níveis de íons amônio, a GS é desadenililada (MERRICK & EDWARDS, 1995).

O processo de adenililação de GS é catalisado pela enzima adenililtransferase (Atase), de massa molecular de 115 kDa e codificada pelo gene *glnE* (JANSSEN & MAGASANIK, 1977). A atividade da enzima Atase também é regulada pela proteína PII que, juntamente com *glnD*, exerce função central no mecanismo da regulação da atividade da GS e no sistema *ntr* (JANSSEN & MAGASANIK, 1977; MERRICK & EDWARDS, 1995).

A proteína PII é um homotrímero com massa molecular de 36 kDa e codificada pelo gene *glnB* (HOLTEL & MERRICK, 1988; VASUDEVAN *et al.*, 1994). Quando os níveis

de íons amônio são limitantes, PII é uridililada a PII-UMP e, nesta forma, promove a desadenililação de GS, reação catalisada pela ATase. Por outro lado, PII não modificada estimula a atividade de adenililtransferase da ATase e a consequente inativação de GS por adenilação. A proteína PII estimula também a atividade fosfatásica de NtrB, que inativa NtrC-P por desfosforilação (BROWN *et al.*, 1971; KAMBEROV *et al.*, 1995). Estudos recentes demonstraram que PII pode se ligar a ATP, 2-oxoglutarato e glutamato (MEL *et al.*, 1994; KAMBEROV *et al.*, 1995). Quando ligada a estes efetores PII pode sofrer uridililação (ADLER *et al.*, 1975; KAMBEROV *et al.*, 1995).

A enzima responsável pela remoção e adição do grupamento UMP à PII é o produto do gene *glnD*. Esta proteína possui duas atividades: uridililtransferase (UTase) e de enzima removedora de uridilil (UR). Sua massa molecular aproximada é de 100 kDa (ADLER *et al.*, 1975; GARCIA & RHEE, 1983). A ligação de 2-oxoglutarato e ATP por PII parece induzir uma mudança conformacional favorecendo sua uridililação por GlnD. Em altos níveis de íons amônio o 2-oxoglutarato é convertido a glutamina pela GS. Nesta situação o produto do gene *glnD* liga-se a glutamina, inibindo sua atividade de uridililtransferase e ativando a de enzima removedora de uridilil, removendo o grupamento UMP de PII-UMP (MEL *et al.*, 1994; KAMBEROV *et al.*, 1995)

A regulação da expressão do gene *glnD* de *E. coli* ainda não está esclarecida. van Heeswijk *et al.* (1993) não encontraram variação na expressão de *glnD* enquanto que Kamberov *et al.* (1995) sugere que a transcrição de *glnD* pode ser regulada por íons amônio.

A proteína NtrB é uma histidina quinase, homodimérica e o monômero apresenta massa molecular de 34 kDa (MacFARLANE & MERRICK, 1985; STOCK, 1989). As proteínas histidina quinases apresentam dois domínios, um sensor, normalmente N-terminal,

e outro com atividade quinase, o C-terminal (MERRICK & EDWARDS, 1995). A fosforilação da proteína NtrC é catalisada por NtrB em condições limitantes de íons amônio; NtrC-P é capaz de ativar transcrição de promotores -24/-12 (NINFA & MAGASANIK, 1986; KEENER & KUSTU, 1988; WEISS & MAGASANIK, 1988). Em altos níveis de íons amônio, a forma não uridililada de PII interage com NtrB, ativando sua atividade fosfatásica que, nesta forma, remove o grupamento fosfato de NtrC (MERRICK & EDWARDS, 1995). NtrC na forma desfosforilada é incapaz de ativar a transcrição dos operons *ntr*-dependentes. Vários estudos têm indicado que o domínio N-terminal de NtrB poderia atuar como receptor de PII, embora isto ainda não tenha sido demonstrado formalmente (ATKINSON & NINFA, 1992; KAMBEROV *et al.*, 1994).

A proteína regulatória NtrC é dimérica e o monômero possui massa molecular de 55 kDa (HAWKES *et al.*, 1985; DRUMMOND *et al.*, 1986). É uma proteína ativadora típica de promotores σ^N -dependente, apresentando três domínios (DELGADO & RAMOS, 1954; DRUMMOND *et al.*, 1986; NIXON *et al.*, 1986). O seu domínio N-terminal apresenta um resíduo conservado de aspartato (Asp-54) que é fosforilado (KLOSE *et al.*, 1993; NINFA & MAGASANIK, 1986; WEISS & MAGASANIK, 1988; SANDERS *et al.*, 1992). A fosforilação de NtrC, embora aumente a afinidade, não é necessária para que este se ligue ao DNA, mas é necessária para induzir a oligomerização dos dímeros de NtrC e ativação da transcrição (WEISS *et al.*, 1992; WYMAN *et al.*, 1997). O domínio central é característico da família de proteínas ativadoras σ^N -dependentes e contém um sítio de ligação a nucleotídeos. Este domínio está envolvido na interação com RNA polimerase- σ^N e hidrólise de ATP (SHIAU *et al.*, 1993; MERRICK & EDWARDS, 1995). A atividade de ATPase de NtrC é essencial para a formação do complexo aberto pela RNA polimerase- σ^N , e é estimulada pela ligação de NtrC ao DNA e por sua fosforilação (WEISS *et al.*, 1991;

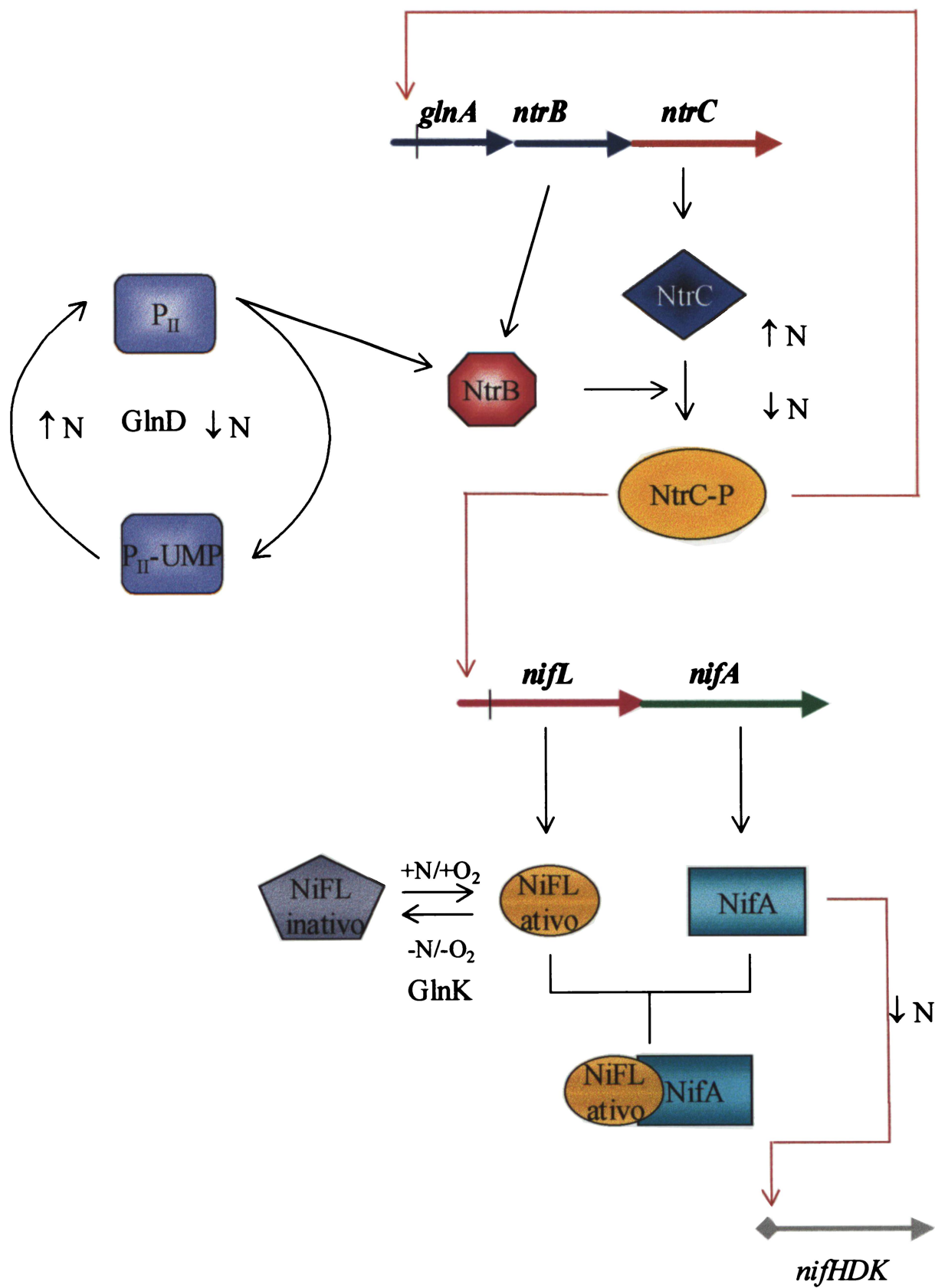
AUSTIN & DIXON, 1992; MERRICK & EDWARDS, 1995). O domínio C-terminal apresenta o motivo hélice-volta-hélice, responsável pela ligação de NtrC ao DNA (SHIAU *et al.*, 1993).

De forma resumida (Figura 2) a regulação do sistema *ntr* ocorre pelo controle da atividade da UTase/UR e da forma da proteína PII (ADLER *et al.*, 1975): em condições de nitrogênio limitante, a UTase adiciona o grupamento UMP ao resíduo de tirosina 51 da proteína PII; PII uridililada promove a desadenililação de GS (reação catalisada pela Atase). PII-UMP não é capaz de interagir com NtrB, que na forma livre catalisa a fosforilação de NtrC. Em presença de íons amônio, a atividade removedora de uridilil de GlnD predomina e PII desuridililada promove a adenililação de GS pela ATase e ativa a atividade de fosfatase de NtrB (MERRICK & EDWARDS, 1995). Assim em condições limitantes de nitrogênio fixado o sistema de assimilação de íons amônio via GS tem sua atividade máxima e as proteínas das vias metabólicas de utilização de fontes de nitrogênio alternativos, incluindo fixação de nitrogênio, tem sua biossíntese ativada por NtrC-P (MERRICK & EDWARDS, 1995).

1.1.4.2 Regulação da Atividade de Nitrogenase

O complexo nitrogenase pode ser inibido reversivelmente em resposta aos níveis celulares de íons amônio, e este processo tem sido denominado de desligamento (“switch-off”) da nitrogenase por íons amônio (PEDROSA, 1988; YATES, 1987).

Em *R. rubrum*, *R. capsulatus*, *A. brasilense*, *A. chroococcum* e *A. lipoferum* o desligamento da nitrogenase por íons amônio ocorre pela ligação covalente de um grupo ADP-ribosil a uma das subunidades idênticas da proteína Fe (POPE *et al.*, 1985).

FIGURA 2. Mecanismo de regulação da expressão dos genes *nif* em *K. pneumoniae*

Duas enzimas estariam envolvidas neste processo, a DRAT (dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase) que catalisa a ADP-ribosilação da proteína Fe e a DRAG (dinitrogenase redutase glico-hidrolase ativadora) que remove o grupo ADP-ribosil, reativando a proteína Fe (LOWERY *et al.*, 1986; POPE *et al.*, 1986). Recentemente foi sugerido que PII regularia a atividade de DRAT e DRAG, mas foi demonstrado que a regulação da inativação da nitrogenase em *R. capsulatus* é independente de PII, o que implica no envolvimento de outro sistema de sensoriamento dos níveis de íons amônio (HALLENBECK, 1992).

Aminoácidos como glutamina ou asparagina também são ativos no processo de desligamento e as concentrações de íons amônio que causam o desligamento da nitrogenase são menores do que as que reprimem a síntese da nitrogenase (POSTGATE, 1982a).

As nitrogenases de *H. seropedicae* e *A. amazonense* são inativadas por íons amônio ou glutamina, mas o mecanismo de inativação é diferente nestas bactérias (PEDROSA & YATES, 1983; HARTMAN *et al.*, 1986; KLASSEN *et al.*, 1997). Nestes organismos não foi demonstrado modificação covalente da proteína Fe e foi sugerido que esta inativação reversível por íons amônio se deve a um desvio de elétrons da nitrogenase (HARTMAN *et al.*, 1986; KLASSEN *et al.*, 1997). Os autores sugerem que o desligamento nestes organismos ocorre por um desequilíbrio na transferência de elétrons para nitrogenase (LAANE *et al.*, 1980; FU & BURRIS, 1989).

A nitrogenase também pode sofrer desligamento por oxigênio, fenômeno que pode ser total ou parcialmente reversível, dependendo da concentração e do tempo de exposição ao oxigênio (ROBSON & POSTGATE, 1980; HARTMAN & BURRIS, 1987). Em *Azotobacter* a proteção conformacional da nitrogenase ocorre pela formação de um complexo entre a nitrogenase e a proteína Shethna (FeSII ou proteína protetora à inativação

pelo oxigênio) (ROBSON, 1979; HILL, 1988; YATES, 1987). Outros microrganismos que apresentam o desligamento por oxigênio da nitrogenase são *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *K. pneumoniae* e *Xantobacter flavus*, porém apenas o último apresenta mecanismo de proteção conformacional semelhante ao de *Azotobacter* (HARTMAN & BURRIS, 1987; HILL, 1988). O oxigênio pode provocar o desligamento reversível da nitrogenase possivelmente causando um desvio do fluxo de elétrons (GOLDBERG *et al.*, 1987).

1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é um microrganismo diazotrofo de vida livre, isolado pela primeira vez da rizosfera ou da superfície de raízes de milho, sorgo e arroz. É uma bactéria aeróbia, gram-negativa, móvel, que fixa nitrogênio em condições de microaerofilia e portanto apresenta interesse econômico potencial por ser capaz de se associar a cereais, gramíneas e cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992).

Inicialmente, *H. seropedicae* foi identificado como uma nova espécie de *Azospirillum*, mas posteriormente com base em sua morfologia, características bioquímicas, estudos de homologia de ácidos nucleicos e padrão proteico de membrana foi possível concluir que se tratava de um novo gênero (BALDANI *et al.*, 1986; FALK *et al.*, 1986; DIANESE *et al.*, 1989; FU & BURRIS, 1989).

H. seropedicae além de apresentar um alto grau de homologia DNA:rRNA, apresenta muitas características bioquímicas e morfológicas em comum com o fitopatógeno *Pseudomonas rubrisubalbicans*, causador das estrias mosqueadas de cana-de-açúcar (GILLIS *et al.*, 1990; PIMENTEL *et al.*, 1991; BALDANI *et al.*, 1996). Porém, quando estes microrganismos foram inoculados na única variedade de cana-de-açúcar brasileira

susceptível à doença, apenas *P. rubrisubalbicans* foi virulenta (PIMENTEL *et al.*, 1991). Estudos posteriores comprovaram que *H. seropedicae* e *P. rubrisubalbicans* pertencem de fato ao mesmo gênero e levaram a reclassificação do segundo microrganismo como *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (PIMENTEL *et al.*, 1991).

Devido a grande dificuldade de isolar *H. seropedicae* do solo, mas apenas a partir da planta, inclusive caule e folhas, foi sugerido que este microrganismo fosse uma bactéria endofítica (BALDANI *et al.*, 1992; DÖBEREINER, 1992a; DÖBEREINER *et al.*, 1993). Este fato foi comprovado recentemente por Boddey *et al.* (1995).

Estudos realizados por Oliveira *et al.* (1995) mostraram que a co-inoculação de *H. seropedicae* e micorrizas em cana-de-açúcar micropropagada auxiliou a bactéria a se estabelecer na planta. Olivares *et al.* (1995) sugeriram que a infecção de *H. seropedicae* em cana-de-açúcar ocorre primeiramente pela fixação na superfície da planta em regiões de ferimentos ou eclosões de raízes secundárias, proliferação no sítio de infecção, penetração, difusão, seguido de colonização e estabelecimento nas partes aéreas.

Várias evidências sugerem que o *H. seropedicae* associado à cultura de cana-de-açúcar, arroz e milho possa contribuir com nitrogênio fixado para a planta ou estimulando o crescimento da planta, constituindo um sistema economicamente viável. Por exemplo, a inoculação de *H. seropedicae* em arroz produziu um aumento do peso seco da planta de até 50% (BALDANI *et al.*, 1996).

A organização estrutural e a regulação dos genes *nif* de *H. seropedicae* tem sido estudada desde 1986. Os primeiros genes isolados foram *nifA* e *nifB* por complementação do mutante *nifA*⁻ de *A. brasilense* FP10 com um plasmídeo recombinante contendo um fragmento de DNA de *H. seropedicae* (PEDROSA & YATES, 1984; SOUZA *et al.*, 1991a; SOUZA *et al.*, 1991b).

A análise da sequência de nucleotídeos da região promotora do gene *nifA* revelou a presença de sítios de ligação para RNA polimerase- σ^N (promotor tipo -24/-12) e para as proteínas NifA e NtrC. Foi identificada ainda uma possível sequência “anaerobox”, localizada após o início de tradução e um potencial sítio do fator de integração do hospedeiro (IHF), localizado a jusante do sítio de ligação para NtrC (SOUZA et al, 1991b). Em *H. seropedicae* a expressão do gene *nifA* parece ser dependente de NtrC e RpoN e é reprimida por íons amônio mas não por oxigênio. Além disto, a expressão do gene *nifA* no mutante *nifA* (*nifA::lacZ*) de *H. seropedicae* é normal, sugerindo que NifA é incapaz de ativar o seu próprio promotor. Porém quando sequências localizadas a montante do sítio de ligação para NifA, incluindo a UAS de NtrC, são deletadas, o promotor *nifA* passa a ser reprimida por íons amônio e oxigênio (SOUZA et al., 1995a) e dependente de NifA. Estudos recentes da regulação do promotor de *nifA* demonstraram que a ativação deste promotor é dependente da sequência promotora na posição 615 e que as proteínas NifA e IHF aparentemente competem pela ligação à mesma região de DNA (WASSEM et al., 1997).

A proteína NifA de *H. seropedicae* apresenta alto grau de homologia com as proteínas de diazotrofos simbióticos como *Azorhizobium caulinodans* e *Rhizobium meliloti* (SOUZA et al., 1991a; SOUZA et al., 1991b) e sua atividade é dependente de íons Fe^{2+} e é inibida por íons amônio e/ou oxigênio. Quando o domínio N-terminal é deletado, a proteína NifA torna-se insensível a íons amônio, mas continua sensível ao oxigênio, indicando que este domínio está envolvido no sensoramento dos níveis de íons amônio (SOUZA et al., 1995b).

Os genes *nifHD* e parte do gene *nifK* também foram isolados por hibridização com uma sonda contendo os gene *nifHDK* de *A. brasilense*. O sequenciamento de DNA desta

região revelou que o promotor do gene *nifH* possui sítios de ligação para RNA polimerase- σ^N , NifA e IHF. Os genes *nifHDK* de *H. seropedicae* são altamente homólogos aos genes *nifHDK* de *Bradyrhizobium japonicum*, *A. brasilense* e *Thiobacillus ferrooxidans*. Através de fusões *nifH::lacZ* foi demonstrado que o promotor do gene *nifH* é ativado por NifA e reprimido por íons amônio e oxigênio (MACHADO *et al.*, 1995).

Os genes *glnA ntrBC* foram clonados e caracterizados, apresentando-se organizados de forma contígua, como em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* (TEIXEIRA *et al.*, 1992). Recentemente estes genes foram sequenciados (RIGO *et al.*, 1996).

Os genes *glnB* e *glnD* de *H. seropedicae* também foram clonados. O gene *glnB* foi sequenciado e caracterizado e o produto deste gene, PII, foi purificado, cristalizado e teve sua estrutura tridimensional determinada (BENELLI *et al.*, 1997a; BENELLI *et al.*, 1997b). Um mutante *glnB* isolado de *H. seropedicae* foi incapaz de fixar nitrogênio (BENELLI *et al.*, 1997b) mas a expressão do gene *nifA* neste mutante foi normal, sugerindo que a proteína NifA tem sua atividade regulada por GlnB, como sugerido para *A. brasilense* (ARSENE *et al.*, 1996).

Na região contígua aos genes *nifHDK* foram identificados os genes *nifE*, *nifN*, *nifX*, ORF1 e ORF2. Ainda adjacentes a esta região foram encontrados os genes *nifQ*, *modABCD*, *fixX* e parte do gene *fixC* (KLASSEN *et al.*, 1997b).

A regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* está centrada na expressão e atividade de NifA. A regulação da expressão do gene *nifA*, reprimida por íons amônio, ocorre através do sistema *ntr* e é RpoN-dependente. A atividade da proteína NifA também é regulada pelos níveis de nitrogênio fixado, num processo que provavelmente envolve os produtos do gene *glnB* e *glnD*, e pelos níveis de oxigênio. Em baixos níveis de nitrogênio

fixado e baixas tensões de oxigênio a proteína NifA está na forma ativa, enquanto que em uma situação inversa a proteína NifA se encontraria na forma inativa (SOUZA, 1990).

O gene *nifB* de *H. seropedicae* foi identificado por Souza (1991b) e a sua região promotora e os primeiros 450 nucleotídeos codificadores foram sequenciados. Na sequência promotora foi identificado dois sítios de ligação para proteína ativadora NifA e a sequência consenso -24/-12. Visando dar continuidade ao trabalho desenvolvido por Souza, foram traçados os objetivos deste trabalho.

2 OBJETIVOS

1. Completar o sequenciamento do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*.
2. Estudar a regulação do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*.
3. Caracterizar os sítios de ligação para as proteínas NifA e RpoN na região promotora do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e Plasmídeos

Os microrganismos e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

3.2 Reagentes

Antibióticos, aminoácidos, albumina bovina, acrilamida, SDS, agarose, lisozima, o-nitrofenol- β -o-galactosídeo, bis-acrilamida, persulfato de amônio, TEMED, Tris base, ditiotreitól, DEAE-cellulose, formaldeído, triton X-100, EDTA e ficoll foram adquiridos de Sigma Chemical Company. O glicerol e o sulfato de amônio foram obtidos da Merck. DEAE sepharose fast flow, padrão de massa molecular de proteínas, Superose 12 HR 10/30, pronase, desoxiribonucleotídeos, enzimas de restrição, T4-DNA ligase, DNA polimerase fragmento Klenow e RNase foram adquiridos de Pharmacia LKB Biotechnology, Bethesda Research Laboratories (BRL), Boheringer Mannheim Biochemica ou de Sigma Chemical Company. Nucleotídeos marcados com [^{35}S] ou [^{32}P] foram adquiridos de Amershan International Corporation. O padrão de tamanho molecular “1 KB

ladder” foi adquirido de BRL. Os demais reagentes foram provenientes de diversas fontes, pró-análise e do mais alto grau de pureza.

TABELA 1. Estirpes e plasmídeos.

Estirpes	Fenótipo/genótipo	Referência
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Estirpe selvagem, Sm ^R , Nif ⁺	SOUZA, E.M.
SmR2126	Sm ^R , Tc ^R , <i>nifB</i> ::Tn5-21	SOUZA, E.M.
SmR2126/1	Sm ^R , Tc ^R , Km ^R , <i>nifB</i> ::Tn5-21, <i>nifA</i> ::Km	SOUZA, E.M.
SmR54	Sm ^R , Km ^R , <i>nifA</i> ⁻	SOUZA, E.M.
<i>Escherichia coli</i> :		
- TH1	Δ <i>glnF2518 (rpoN)</i> e <i>AhsdR</i> <i>supE44</i> Δ <i>lac4169 BI</i> ⁻	HUNT & MAGASANIK, 1985
- S17.1	Sm ^R Sp ^R Tra ⁺ <i>pro thi recA hsdR</i> (RP4-2 <i>kan</i> ::Tn7 <i>tet</i> ::Mu, integrado no cromossoma)	SAMBROOK et al., 1989.
- ET8894	Δ (<i>rha glnA, ntrB ntrC</i>) <i>rbs gyrA hutCK lacZ</i> ::1S1 Mucts62	BUCHANAN-WOLLASTON et al., 1981.
- DH5 α	<i>recA13 endA1 gyrA</i> Δ <i>lac</i>	Gibco-BRL
- 71.18	F ⁺ [<i>proAB</i> ⁺ <i>lac</i> ^a <i>lacZ</i> Δ M15] <i>supE thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	SAMBROOK et al., 1989

Plasmídeos	Fenótipo/genótipo	Referência
- pMC71A	Cm ^R <i>KpnifA</i> é expresso constitutivamente pelo promotor <i>tet</i> de pACYC184	BUCHANAN-WOLLASTON <i>et al.</i> , 1981.
- pNH11	Fragmento de 2,2 Kb <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> de <i>KpnifA</i> de pRT903 em pMM40. Expressa <i>nifA</i> sob controle do promotor <i>tac</i> .	HENDERSON <i>et al.</i> , 1989
- pPW452	Tc ^R , vetor de fusão transcricional <i>lacZ</i>	WOODLEY, P.
- pEMS304	Amp ^R fragmento <i>SalI</i> de 1,1 Kb clonado em pTZ18R	SOUZA, E.M.
- pEMS140	Tc ^R Mob ⁺ . promotor <i>nifB</i> clonado em pPW452.	SOUZA, E. M.
- pTZ18R	Vetor multifuncional de clonagem e sequenciamento.	Pharmacia
- pEMS110	<i>nifB</i> ::Tn5-21 clonado no pSUP202	SOUZA, E.M
- pSUPnifAKIXX	Fragmento de <i>SalI</i> 2,1 Kb contendo o gene <i>nifA</i> ::Km de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pSUP202	SOUZA, E.M.
- pR2073	Tra ⁺ Sm ^R	LEONG, 1982
- pRK2013	Tra ⁺ Km ^R	FIGURSKI & HELINSKI, 1979
- pWVC93025	Gene <i>rpoN</i> de <i>K. pneumoniae</i> clonado em pMM40. Expressa <i>rpoN</i> sob controle do promotor <i>tac</i>	CANON, W.

3.3 Antibióticos

As concentrações utilizadas de antibióticos para estirpes de *Escherichia coli* foram as seguintes: ampicilina 200 µg/mL, canamicina 50 µg/mL, cloranfenicol 30 µg/mL, estreptomicina 10 µg/mL e tetraciclina 10 µg/mL. Para *Herbaspirillum seropedicae* foram: estreptomicina 80 µg/mL, canamicina 500µg/mL e tetraciclina 10 µg/mL.

Ampicilina, canamicina e estreptomicina foram preparadas com água milli-Q, esterilizados por filtração (filtro Millipore 0,45 µm) e estocados a -20°C. Cloranfenicol e tetraciclina foram solubilizados em etanol 95% e as soluções mantidas a -20°C.

3.4 Meios de Cultura

H. seropedicae foi cultivado em meio NFbHP (MACHADO *et al.*, 1991), sendo que o lactato de sódio foi substituído por malato de sódio (NFbHP malato) e o pH do meio foi ajustado para 6,0. No momento do uso, o meio foi suplementado com 20 mmol/L cloreto de amônio ou 5 mmol/L de glutamato monossódico e 50 mL/L da mistura de fosfatos (K_2HPO_4 17,8 g/L e KH_2PO_4 159,5 g/L), fornecendo pH final de 6,0. O meio NFbHP contendo íons amônio foi denominado NFbHPN e o meio contendo glutamato e fosfato de NFbHPG.

Os meios NFbHPN sólido e semi-sólido possuem a mesma composição que o líquido, mas acrescidos de 1,5 e 0,15% de ágar, respectivamente.

A composição do meio NFbHP-malato é a seguinte:

	gramas/litro
KH ₂ PO ₄	7,97
K ₂ HPO ₄	0,89
MgSO ₄ .H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	$2,0 \times 10^{-2}$
Ácido nitrilo triacético	$5,6 \times 10^{-2}$
FeSO ₄ .7H ₂ O	$2,0 \times 10^{-2}$
Biotina	$1,0 \times 10^{-4}$
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	$2,0 \times 10^{-3}$
MnSO ₄ .H ₂ O	$2,4 \times 10^{-3}$
H ₃ BO ₃	$2,8 \times 10^{-3}$
CuSO ₄ .5H ₂ O	$8,0 \times 10^{-3}$
ZnSO ₄ .7H ₂ O	$2,4 \times 10^{-4}$
Ácido málico	5,0

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em Luria-Bertani Broth (LB), Luria-Bertani Agar (LA) (SAMBROOK *et al*, 1989), Terrific Broth (TARFOD & HOBBS, 1987) ou NFDM (DIXON, 1977).

A composição do meio LB é a seguinte:

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Água q.s.p.	1000 mL

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 mol/L. A formulação do meio LA é a mesma do meio LB acrescido de 1,5%p/v de ágar.

O meio Terrific Broth apresenta os seguintes componentes:

Bacto triptona	12 g
Extrato de levedura	24 g
Glicerol	4 mL
Água destilada q.s.p.	900 mL

Após esterilização do meio por autoclavagem, 100 mL da solução de fosfatos (KH_2PO_4 0,17 mol/L e K_2HPO_4 0,72 mol/L) e glucose (20 mmol/L final) foram acrescentadas.

O meio NFDM é um meio mínimo e tem a seguinte composição:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1%	25mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% em HCl 20 mol/L	25 mg
Glucose	20 g
Água destilada q.s.p.	950 mL

Cinquenta mililitros da solução de fosfatos vinte vezes concentrada (KH_2PO_4 241,2 g/L e K_2HPO_4 68 g/L) foi adicionada ao meio NFDM no momento do uso, bem como a solução de cloreto de amônio (concentração final de 20 mmol/L). Este meio foi suplementado com 5 $\mu\text{g/mL}$ de tiamina.

Para se obter os meios sólidos, os respectivos meios líquidos foram acrescido de 1,5% de ágar.

As bactérias foram estocadas em meio NFbHPN semi-sólido a temperatura ambiente ou em glicerol 50% a -20°C .

3.5 Purificação de DNA

3.5.1 Mini-preparação de Plasmídeo (mini-prep)

A purificação de plasmídeos de *E. coli* em pequena escala foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al*, 1989).

Aliquotas (1,5 mL) de culturas de *E. coli* cultivadas em meio TB a 37°C sob forte agitação (220 rpm) por 12-16 horas foram coletadas para centrifugação (13000 rpm por 1 min). A massa celular foi suspensa em 150 μL de uma solução gelada de GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L) e lisada pela adição de 150 μL de uma solução de NaOH 0,2 mol/L contendo 1% de SDS. Para precipitar o SDS, DNA cromossomal, restos celulares e proteínas 150 μL de KAcF (acetato de potássio 3 mol/L,

ácido fórmico 1,8 mol/L) foi acrescentado à mistura e mantido no gelo por 5 minutos. Finalmente, foram adicionados 50 µL de fenol:álcool isoamílico:clorofórmio (25:24:1) para inativar nucleases. Após centrifugação em centrífuga Eppendorf (modelo 5410) (13000 rpm por 5 min), a fase aquosa foi coletada e o DNA plasmidial precipitado com etanol 95% por aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi submetido a duas lavagens com álcool a 80%, seco à vácuo e ressuspenso em 20 µL de tampão Tris-HCl 10 mmol/L e EDTA 1 mmol/L (T₁₀E₁).

3.5.2 Maxi-preparação de Plasmídeos (maxi-prep)

A obtenção de plasmídeos em larga escala foi realizada segundo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Este procedimento consistiu em uma mini-preparação em maior escala, ou seja, foram utilizados um maior volume de culturas e de reagentes: para 20 mL de cultura foi utilizado 5 mL de GET, 5 mL de tampão de lise, 5 mL de KAcF e 2,5 mL de fenol:álcool isoamílico:clorofórmio (1:24:1). No restante, o protocolo foi o mesmo, com exceção da troca de etanol absoluto por álcool iso-propílico e um tempo de incubação maior (30 minutos a temperatura ambiente) para precipitar o DNA.

3.5.3 Purificação de DNA Total de *H. seropedicae*

As células foram obtidas por centrifugação a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos de uma cultura recente de *H. seropedicae* crescida em meio NFbHPN. As células foram ressuspensas em 500 µL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L e EDTA 20 mmol/L (T₅₀E₂₀) contendo 100 mmol/L de NaCl. Após completa ressuspensão, foram adicionados SDS e pronase até as concentrações finais de 1% e 100 µg/mL, respectivamente. O lisado, após incubação a 37°C por 3 a 4 horas, foi desproteinizado várias vezes com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) até que não houvesse formação de precipitado na interfase. Posteriormente, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, centrifugado e lavado com etanol a 80%. Após secagem a vácuo o DNA foi ressuspense em 200 µL de tampão T₁₀E₁ contendo 100 µg/mL de RNase e incubado por 1 hora a 37°C. O lisado foi desproteinizado, precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 80%, seco à vacuo e ressuspense em 100 µL T₁₀E₁.

3.6 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

As eletroforeses de DNA em gel de agarose foram realizadas como descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Os géis foram preparados na concentração desejada, normalmente a 0,7%, em tampão TBE (Tris-base 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8,0) ou TAE (Tris-base 40 mmol/L, acetato de sódio 5 mmol/L, EDTA 1 mmol/L pH

8,0) e as corridas eletroforéticas foram realizadas nos mesmos tampões em que os géis foram preparados. As amostras foram misturadas ao tampão de aplicação FSUDS (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, ficoll 20% em T₁₀E₁) na proporção de 4:1 e aplicadas no gel. A corrida foi desenvolvida entre 25 a 60 V durante um período que variava conforme a separação desejada dos fragmentos. A solução reveladora continha brometo de etídio (0,5 µg/mL) e a visualização das bandas foi através de um transiluminador ultravioleta de 312 nm.

3.7 Digestão de DNA com Enzimas de Restrição

As condições de digestão pelas diferentes enzimas de restrição respeitaram as recomendações dos fabricantes. Sendo que este procedimento se resumiu à incubação do DNA e a enzima de restrição em seu tampão ótimo, em um volume final de restrição variável por um período de 1 a 2 horas a 37°C.

3.8 Ligação dos Fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA a serem ligados que possuíam pontas coesivas ou pontas cegas foram misturados na proporção 1:5 (vetor:inserto) em um volume variável (10-30 µL). A mistura de fragmentos foi aquecida durante 10 minutos a 65°C e resfriada

rapidamente em gelo. A esta solução foi adicionado tampão ligase (Tris.HCl 50 mmol/L pH 7,6, MgCl₂ 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L, ATP 0,5 mmol/L, PEG 5%) e a enzima T4-DNA ligase (0,5 a 1 U), e esta mistura foi incubada a 16-22°C por 12-24 horas. Para verificar o sucesso da reação de ligação, uma alíquota do sistema foi submetido a eletroforese em gel de agarose.

Quando o inserto foi um produto de PCR, um resíduo A (dATP) foi introduzido nas extremidades 3' do inserto e um resíduo T (dTTP) nas extremidades 3' do vetor. Desta forma, vetor e inserto possuíam extremidades coesivas. Para isto foi utilizado o seguinte procedimento: ao vetor dissolvido em tampão da enzima Taq DNA polimerase (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol/L KCl), foi adicionado MgCl₂ (1,5 mmol/L), dTTP (0,2 mmol/L) e Taq DNA polimerase (1U), e o volume final foi acertado para 50 µL. A mistura de reação foi incubada a 72°C por 30 minutos. Para que fosse evitada a redução de volume da solução por evaporação, foi adicionado óleo mineral ao sistema. O inserto foi tratado da mesma maneira, mas foi utilizado dATP ou invés de dTTP. A ligação foi realizada da mesma forma como descrito acima, mas em uma relação 1:10 (vetor:inserto).

3.9 Transformação Bacteriana por Choque Térmico de *E. coli*

A transformação de *E. coli* com DNA plasmidial foi realizada segundo Miller (1992). Primeiramente as células utilizadas para o processo de transformação sofreram um tratamento para se tornarem aptas a receber o plasmídeo, ou seja, competentes. Culturas

recentes de estirpes de *E. coli* com D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,05 foram incubadas a 37°C sob forte agitação (200 rpm) até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,3 a 0,5. As culturas foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm, 4°C por 5 minutos). O sedimento de células foi ressuspenso em tampão TSS (meio LB 85%, PEG 8000 10%, DMSO 7% e MgCl₂ 10 mmol/L pH 6,5) e a suspensão aliquoteada e mantida a -70°C.

Alíquotas de 20 µL das células competentes foram incubadas por 30 min em banho de gelo com 1 a 10 µL do plasmídeo de interesse. A mistura então foi submetida a um choque térmico (2 min em banho maria a 42°C), seguido de incubação em gelo por mais 15 min. A suspensão de células foi então incubada a 37°C por 1-2 horas com meio de cultura LB e plaqueada em meio LA contendo os antibióticos necessários.

3.10 Transformação Bacteriana por Choque Elétrico de *E. coli*

A técnica de eletroporação foi realizada conforme descrito por Sambrook *et al* (1989). No preparo de células eletrocompetentes, culturas de estirpes de *E. coli* com D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,02 foram incubadas a 37°C sob forte agitação (200 rpm) até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,8 a 1,0. As culturas foram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos, coletadas por centrifugação (5000 rpm, 4°C por 5 minutos) e lavadas (duas vezes com água milli-Q). As células eletrocompetentes foram ressuspensas em glicerol 20%, aliquoteadas e mantidas a -70°C.

Para eletroporação, as células eletrocompetentes (20 μ L) foram misturadas com um volume de 0,5 a 1 μ L de plasmídeo de interesse e cuidadosamente colocadas nas cubas de eletroporação para serem submetidas a um choque elétrico rápido (4 K Ω , 320 μ F). Um mililitro de meio LB foi adicionado à suspensão de células que foi incubada por 45 min a 37°C e posteriormente plaqueada em meio sólido LA com os devidos antibióticos.

3.11 Conjugação Bacteriana

A conjugação foi realizada segundo Hanke com modificações (1995). Primeiramente, 1 mL de cultura de *H. seropedicae* com D.O.₆₀₀ de aproximadamente 1,0 a 1,3 foi adicionado de 10 μ L de lisozima (20 mg/mL) e incubado por 30 minutos a 30°C. Quando a *E. coli* doadora não possuía os genes *tra*⁺, volumes iguais de cultura de *E. coli* doadora e *E. coli* contendo plasmídeo auxiliar (pRK2013 ou pRK2073) foram misturadas e incubadas por 1 hora a 37°C. Um volume de 50 μ L da *E. coli* doadora ou da mistura de *E. coli* (doadora + auxiliar) foi adicionado a 1 mL de cultura de *H. seropedicae*, previamente tratada com lisozima. Esta mistura foi então centrifugada por 30 segundos a 12000 rpm e a solução sobrenadante descartada. O precipitado celular foi lavado com sulfato de magnésio 10 mmol/L e centrifugado. As células foram ressuspensas em 50 μ L de sulfato de magnésio e a suspensão depositada sobre uma membrana de nitrocelulose em meio sólido contendo NFbHPN e LA na proporção de 3:1. As culturas foram então incubadas por 24 horas a 30°C, a massa de células foi ressuspensa em 1 mL de meio NFb e

plaqueada (200 µL) em meio NFbHPN seletivo contendo as fontes de carbono e antibióticos requeridos.

3.12 Estratégia para Sequenciamento da Porção Final do Gene *nifB*

Um "primer" (5' CACGAGCGACGCCGATTATCG3'; *nifB*-1) complementar à porção final sequenciada do gene *nifB* (SOUZA *et al.*, 1991a) foi sintetizado e utilizado para amplificar a região a jusante do gene *nifB* em uma reação de PCR (PARK *et al.*, 1996). Para esta amplificação foi utilizado como molde o DNA cromossomal de *H. seropedicae* e como segundo "primer" o "primer" universal. O sistema de reação consistia de 0,5 µg de DNA, 2,0 µL de dNTP (5 mmol/L), 1,0 µL de "primer" universal e *nifB*-1 (10 pmol cada), 5,0 µL de tampão de PCR 10 vezes concentrado (200 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 500 mmol/L KCl), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mmol/L); 38,8 µL de água (q.s.p. 50 µL) e 0,2 µL de enzima Taq polimerase (1U). Com a finalidade de evitar evaporação, óleo mineral foi adicionado ao sistema. A reação de PCR se constituiu de três etapas: 1ª etapa com um ciclo (96°C-2 min, 40°C-30 seg e 72°C-2 min); 2ª etapa com 40 ciclos (96°C-30 seg, 50°C-30 seg e 72°C-2 min) e a 3ª etapa com um ciclo (96°C-30 seg, 50°C-30 seg e 72°C-10 min). O produto de PCR obtido (aproximadamente 1 kb) foi clonado no vetor de sequenciamento pTZ18R produzindo o plasmídeo denominado pFR1.

3.13 Obtenção de Deleções para o Sequenciamento

Os plasmídeos pFR1 e pEMS304 foram digeridos com as enzimas de restrição *SacI* e *BamHI*, precipitados com etanol 95% e submetidos a reação de deleção segundo Henikoff (1984).

A amostra digerida foi incubada a 37°C por 5 minutos em presença do tampão para DNA exonuclease (EXO III) (Tris-HCl 660 mmol/L, MgCl₂ 0,66 mmol/L pH 8,0), acrescida da enzima DNA exonuclease (EXO III) (200 U) e alíquotas de 2,5 µL foram retiradas a cada 20 segundos e colocadas em outro tubo de microcentrífuga em banho de gelo contendo tampão de parada (NaCl 0,2 mol/L e EDTA 12 mmol/L). Quatro frações foram coletadas nos dois primeiros tubos de microcentrífuga e duas frações no último tubo. A EXO III foi inativada através de incubação a 72°C por 10 minutos e o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco á vácuo. As extremidades de fitas simples foram eliminadas pela ressuspensão do DNA em 50 µL de mistura de nuclease S1 (acetato de potássio 30 mmol/L pH 4,6, NaCl 250 mmol/L, ZnSO₄ 1 mmol/L, glicerol 5% e 67 U/mL de nuclease S1) e incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. A enzima nuclease S1 foi inativada por extração com 25 µL de fenol e 25 µL de clorofórmio, o DNA precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco á vácuo. O precipitado foi ressuspensão em 10 µL de mistura de DNA polimerase (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, MgCl₂ 10 mmol/L, β-mercaptoetanol 1 mmol/L, dNTP 0,5 mmol/L e 10 U/mL de DNA polimerase fragmento Klenow) e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Ao sistema foi adicionado 40 µL da mistura de ligase (Tris.HCl 50 mmol/L pH

7,6, MgCl_2 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L, ATP 5 mmol/L, PEG 5%, T4-DNA ligase 1U e água q.s.p. 40 μL) e incubado por 16 horas a 15°C. Um microlitro desta mistura foi utilizado para transformar *E. coli* estirpe 71-18.

3.14 Produção de DNA Fita Simples para Sequenciamento

Uma colônia isolada da estirpe de *E. coli*, 71.18, capaz de ser infectada por bacteriófago M13 K07, carreando o plasmídeo de interesse, foi retirada de placas em meio mínimo (NFDM), inoculada em 3 mL de meio TB contendo 2% de glucose e fago M13 K07 (10^9 - 10^{10} pfu) em frascos de 60 mL e incubada a 37°C por 24 horas (1:20). O sistema de infecção foi incubado sob agitação a 37°C por 24 horas.

3.15 Purificação de DNA Fita Simples para Sequenciamento

A cultura infectada pelo fago M13K07 foi centrifugada e 1 mL da solução sobrenadante tratada com 250 μL de uma solução de PEG 20% e NaCl 2,5 mol/L e mantida em gelo por 30 minutos. A amostra então foi centrifugada (13000 rpm por 10 min), o sobrenadante descartado, e para sua eliminação total, uma centrifugação adicional (13000 rpm por 30 seg) foi realizada. O precipitado foi ressuspenso em 100 μL em T_{10}E_1 e extraído com 50 μL de fenol, seguido de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (1:24:1)

e com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi coletado e o DNA precipitado com três volumes de etanol absoluto e o precipitado lavado três vezes com etanol 80%, seco à vácuo e ressuspenso em 10 µL de T₁₀E₁.

3.16 Purificação de DNA Dupla Fita para Sequenciamento

Os transformantes de *E. coli* estirpe DH5α contendo os plasmídeos recombinantes do pTZ18R foram inoculados em 5 mL de meio Terrific Broth com os antibióticos requeridos e foram incubados a 37°C sob agitação (200 rpm) até atingirem D.O. 1,5 a 2,0. As células coletadas por centrifugação foram submetidas a uma mini-prep (ítem 3.5.1 de Material e Métodos) no primeiro passo de purificação do plasmídeo. A seguir, a preparação de plasmídeo foi submetida a um tratamento com RNase (1 mg/mL) por 4 horas a 37°C. O segundo passo da purificação consistiu em duas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, precipitação com etanol absoluto e três lavagens do DNA precipitado com etanol 80%. O precipitado foi ressuspenso em 5 µL de água milli-Q estéril.

3.17 Sequenciamento

O sequenciamento foi feito pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger & Coulson (1977), utilizando 2'3'dideoxynucleotídeos fluorescentes em sequenciador automático Perking-Elmer ABI PRISM 310.

DNA simples fita (0,5-1µg) e dupla fita purificados (1-5µg) foram acrescidos de 2,62 µL de tampão TACS (Tris 106 mmol/L, MgCl₂ 2,6 mmol/L e (NH₄)₂SO₄), 1,5 µL de "primer" (10 pmol) e 8,0 µL de mistura para sequenciamento Terminator Ready Rxn Mix (Perkin-Elmer). Esta solução então foi submetida a uma reação de PCR que consistia dos seguintes passos: 1 ciclo: 95°C-5 min e 96°C-30 seg, 40°C-30 seg e 65°C-6 min repetidos trinta vezes. A purificação dos produtos de PCR foi realizada segundo recomendação do fornecedor do kit de sequenciamento.

Aos 20 µL de amostra foram acrescentados 2,0 µL de acetato de sódio 3 mols/L (1,2 mols/L) ou 7,2 µL de acetato de amônio 7,4 mols/L (2,7 mols/L) e 50 µL ou 80 µL de etanol absoluto e deixado em gelo por 15 minutos. A seguir a amostra foi centrifugada (13000 rpm por 15 min), o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol a 80%. O precipitado foi seco à vácuo e ressuspensão em 15 µL de TSR (Template Supression Reagent) e submetido ao sequenciador automático Perkin Elmer.

3.18 Obtenção do Fragmento Contendo o Promotor *nifB* e Marcação com ³²P

A marcação radioativa do fragmento contendo o promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi feita de duas maneiras, uma em que o fragmento de DNA contendo o promotor *nifB* foi marcado na ponta 5' e outra em que "primers" utilizados para a amplificação desta região estavam marcados.

O fragmento de DNA contendo o promotor *nifB* foi obtido por uma reação de amplificação em cadeia (PCR) utilizando dois "primers" ("primer" 11, 5'GTATTGATGGATTCCCCGGC3'; e "primer" 12, 5'TCCAGCAAGGTGCCTAGGC3') complementares às regiões 2570 e 2850 do gene *nifB*, respectivamente. Na reação de PCR foi utilizado como molde o plasmídeo pEMS300 contendo fragmento *Sal* I de 2,1 Kb e o fragmento obtido foi de aproximadamente 280 pares de base. O sistema de reação continha 0,5 µg de DNA molde, 2,0 µL de dNTP (5 mmol/L), 1,0 µL de cada "primer" (10 pmol/µL), 5,0 µL de tampão de PCR concentrado 10 vezes (200 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 500 mmol/L KCl), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mmol/L), 38,8 µL de água (q.s.p. 50 µL) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (1U). O programa para a amplificação consistiu de seguintes passos: 96°C-1 min, 30°C-30 seg e 72°C-30 seg 2 ciclos; 96°C-30 seg, 40°C-30 seg e 72°C-30 seg 30 ciclos; e 96°C-30 seg, 40°C-30 seg e 72°C-2 min um ciclo. O produto de PCR obtido foi purificado por extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol, dissolvido em 20 µL de água e o DNA quantificado por espectrofotometria.

O DNA foi marcado com ³²P segundo Sambrook *et al.* (1989). Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram adicionados 2 pmol de DNA, 2 µL de tampão T4 polinucleotídeo quinase dez vezes concentrado (Tris-HCl 500 mmol/L pH7,6; MgCl₂ 100 mmol/L e DTT 50 mmol/L), 1µL de [γ-³²P] rATP (3000Ci/mmol/L) e 1µL de T4 polinucleotídeo quinase (10 unidades) em um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. A T4 polinucleotídeo quinase foi inativada por tratamento térmico a 72°C por 15 minutos.

Alternativamente, os "primers" foram marcados com [γ - ^{32}P] rATP antes da reação de PCR. Vinte pmols do "primer" p11 ou p12 foram marcados num sistema contendo 10 U de T4 polinucleotídeo quinase (Gibco), tampão (70 mmols/L Tris-HCl pH 7,6, 10 mmols/L MgCl_2 , 1000 mmols/L KCl e 1 mmol/L 2-mercaptoetanol) e 10 μCi de [^{32}P] γATP , e incubado a 37° C por 30 minutos. A região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi então amplificada com os "primers" marcados como descrito acima.

3.19 Superexpressão e Purificação Parcial da Proteína NifA de *K. pneumoniae*

A proteína NifA de *Klebsiella pneumoniae* foi parcialmente purificada segundo Austin *et al.* (1990). As culturas (0,5 mL) das estirpe TH1 e ET8894 contendo ou não o plasmídeo pNH11 foram inoculadas em meio LB (50 mL) e incubadas sob agitação a 37°C até atingirem D.O._{600} 0,5. IPTG foi adicionado (1 mmol/L) para a indução da expressão da proteína NifA por 5 horas a 30°C. As células obtidas por centrifugação (5000 rpm por 5 min a 4°C) foram ressuspensas em 2,5 mL tampão (Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,0, EDTA 1 mmol/L, DTT 1 mmol/L, lisozima 23 $\mu\text{g/mL}$, PMSF 0,2 mmol/L e glicerol 10%), lisadas por sonicação (10 vezes em força 2 por 20 seg) e os restos celulares foram removidos por centrifugação (13000 rpm por 15 min a 4°C). Para remover fragmentos de DNA, a amostra foi tratada com 2% em p/v de sulfato de estreptomicina e homogeneizada por 20 minutos a 4°C. Após centrifugação (13000 rpm 15 min a 4°C), o sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio (50%, 30 min a 4°C) e o precipitado ressuspenso em 500 μL de tampão (Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, EDTA 0,2 mmol/L, DTT 1 mmol/L, NaCl 0,05 mols e glicerol

20%). Finalmente a amostra foi dialisada no próprio tampão de ressuspensão por 16 horas e mantida em nitrogênio líquido.

3.20 Purificação da Proteína RpoN de *K. pneumoniae*

A purificação parcial da proteína RpoN (sigma-54) foi realizada segundo Hunt & Magasanik (1985) com modificações.

3.20.1 Preparo da Cultura e do Extrato Livre de Células

A proteína RpoN foi expressa a partir do plasmídeo de superexpressão pWVC 93025 (CANNON *et al.*, 1993). Neste plasmídeo a sequência que codifica a proteína RpoN está fusionada ao promotor *tac*. A estirpe TH1 (RpoN⁺) de *E. coli* contendo o plasmídeo pWVC 93025 foi crescida em dois litros de meio LB contendo ampicilina (200 µg/mL) a 30°C até a D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,3 (3 horas de incubação). Em seguida, IPTG (0,5 mmol/L) foi adicionado e a cultura incubada por mais 12 horas a 30°C. A cultura foi resfriada em gelo, as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm por 10 min a 4°C), ressuspensas em 30 mL do tampão de ressuspensão (Tris-HCl 50 mmol/ L pH 7, 8; DTT 1 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; Triton X-100 0,5%; glicerol 10%, PMSF 0,2 mmol/L e NaCl 500 mmol/L) e, finalmente, lisadas em French Press (14000 psi). Aos 20 mL de lisado foram adicionados 0,2 mmol/L de PMSF. Os restos celulares foram removidos por centrifugação (15000 rpm por 15 min a 4°C).

3.20.2 Cromatografia em Coluna DEAE-Cellulose

Para eliminar fragmentos de DNA da amostra o sobrenadante foi cromatografado em coluna de DEAE-Cellulose em 0,5 mols/L de NaCl.

A coluna de DEAE-cellulose (20 X 60 mm) foi equilibrada com tampão de ressuspensão (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,8; DTT 1 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; Triton X-100 0,5%; glicerol 10% e NaCl 500 mmol/L) e carregada com 17 mL de amostra. A amostra foi eluída no mesmo tampão em um fluxo de 8 gotas/min. O eluato (35 mL) foi coletado em apenas uma fração.

3.20.3 Fracionamento com Sulfato de Amônio

Ao eluato da coluna DEAE-cellulose (35 mL) foi adicionado lentamente sulfato de amônio para se obter saturação final de 30% (5,74 g). A mistura foi homogeneizada por 30 minutos a 4°C e o precipitado foi removido por centrifugação (15000 rpm por 15 min a 4°C). Aos 36 mL de sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até saturação final de 60% (6,5 g). O precipitado foi obtido por centrifugação (15000 rpm por 15 min a 4°C) e dissolvido em 12,5 mL de tampão de diálise (20 mmol/L de imidazol pH 7,0; 1 mmol/L DTT; 0,5% Triton X-100; 10% glicerol e 180 mmol/L NaCl) e a preparação dialisada por 16 horas neste tampão (1000 mL).

3.20.4 Cromatografia em Coluna de DEAE-sepharose Fast Flow

A amostra dialisada (12,5 mL) foi aplicada em coluna de DEAE-sepharose Fast Flow (129 mm X 16 mm) acoplada ao FPLC (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com tampão de diálise (imidazol 20 mmol/L pH 7,0; DTT 1 mmol/L; Triton X-100 0,5%; glicerol 10% e NaCl 180 mmol/L) e eluída em um gradiente de concentração de 180 a 700 mmol/L de NaCl em um fluxo de 0,5 mL/min. Quatrocentos e dezoito frações foram coletadas, sendo que as frações 1 a 363 foram de 250 µL e as frações 364 a 418 de 1,5 mL. Eletroforese em SDS-PAGE foi realizada para determinar em que frações a proteína se encontrava. As frações 305 a 360 foram reunidas (12,6 mL) e dialisadas contra o tampão A (Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0; DTT 1 mmol/L; EDTA 0,1 mmol/L; glicerol 10% e NaCl 50 mmol/L) por 16 horas a 4°C.

3.20.5 Concentração da Amostra com Sulfato de Amônio

A amostra dialisada (13,2 mL - volume após a diálise) foi precipitada com 60% sulfato de amônio (4,76g). O precipitado obtido foi dissolvido em 200 µL de tampão A (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 1 mmol/L DTT; 0,1 mmol/L EDTA; 10% glicerol e 50 mmol/L NaCl) e aplicado em uma coluna Superose 12 HR 10/30.

3.20.6 Cromatografia em Coluna de Superose 12 HR

A coluna Superose 12 HR 10/30 (300 mm X 20 mm), acoplada ao FPLC, foi equilibrada com tampão A e carregada com 200 μ L de amostra. A amostra foi eluída com o mesmo tampão em um fluxo de 0,2 mL/min. Cento e dezenove frações foram coletadas. Eletroforese em SDS-PAGE foi realizada para se determinar em que frações a proteína se encontrava. As sete frações onde a proteína se encontrava em grande concentração, foram as frações 47 a 53.

3.21 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante com SDS

O método utilizado foi o descrito por Laemmli (1970), em gel de 1 mm de espessura. A concentração de acrilamida no gel de empilhamento foi de 4% e no gel separador de 12%, e a relação acrilamida: bis-acrilamida foi de 30:1. A corrida foi realizada em voltagem constante (200 V) por 45 minutos.

3.22 Ensaio de Retardamento Eletroforético do *pnifB* pela Proteína NifA e RpoN

Este ensaio foi realizado segundo Feng *et al* (1995) e Rickwood & Hames (1990).

A proteína NifA ou RpoN de *K. pneumoniae* (20 ng) foi incubada em tampão (Tris-acetato 10 mmol/L, acetato de magnésio 8 mmol/L pH 8.0, acetato de potássio 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L and PEG 3.5%) contendo 1 µg DNA de tимо, quando indicado, por 1 minuto. O fragmento de 320 pb de DNA contendo o promotor do gene *nifB* (6.4 pg) marcado radioativamente foi então adicionado e incubado por 3 minutos. As amostras foram adicionadas de 10% de glicerol no momento de aplicação no gel. A corrida eletroforética em gel de acrilamida nativa (4%) foi realizada por 2 horas em tampão TAE (0,625 X) a 70 V a 4°C. O gel foi seco e autorradiografado.

3.24 Métodos Analíticos

3.24.1 Determinação da Atividade de β-galactosidase

Estirpes de *E. coli* cultivadas em meio LB foram inoculadas (50 µL) em 2,0 mL de meio mínimo NFDM suplementado com 10 µg/mL de glutamina e 20 mmol/L de cloreto de íons amônio (condição de repressão) ou 100 µg/ de serina mL (condição de desrepressão), incubados a 30°C por 18 horas.

Em *H. seropedicae*, as estirpes foram cultivadas em meio NfbHPN até D.O. 1,5. As células foram coletadas e ressuspensas em NFbHP D.O.₆₀₀ 0,2 e incubadas a 30°C por 6 horas em presença (20 mmol/L) ou ausência de cloreto de íons amônio e em presença de 20% ou 1,5% de oxigênio.

Em ambos os casos a atividade de β -galactosidase foi determinada segundo Miller (1992). Unidade Miller foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{número de U Miller} = 1000 \cdot \left(\frac{\text{D.O.}_{420} - (\text{D.O.}_{600} \times 1,75)}{\text{volume de cultura} \times \text{D.O.}_{600} \text{ da cultura} \times \text{tempo}} \right)$$

3.24.2 Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada segundo a técnica descrita por Lowry (1951) ou Bradford (1979). O padrão utilizado foi de albumina de soro bovino.

3.24.3 Dosagem de Oxigênio Molecular

A concentração de oxigênio, na fase gasosa foi determinada em cromatógrafo Varian. O gás de arraste foi argônio e a coluna utilizada MS 5A. O sistema de detecção foi de condutividade térmica e como padrão foi utilizado ar atmosférico (20,9% de O₂ e 79,1% de N₂).

3.24.4 Quantificação de DNA por Espectrofotometria

A concentração de DNA foi determinada empregando a seguinte relação: D.O.₂₆₀ igual a 1,0 corresponde a concentração de 50µg/mL de DNA dupla fita ou de 37 µg de DNA simples fita (SAMBROOK *et al*, 1989). As soluções de ácidos nucleicos foram consideradas puras quando apresentavam uma relação D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ entre 1,8 a 2,0.

4 RESULTADOS

4.1 Sequenciamento do Gene *nifB* de *H. seropedicae*

O plasmídeo pEMS304 contém o inserto de *SalI* de 1,1 kb de DNA de *H. seropedicae*. Esta região está adjacente ao gene *nifA* e presumivelmente contém todo o resto do gene *nifB* de *H. seropedicae*. O conjunto de deleções obtido a partir de pEMS304 foi ordenado por tamanho e os clones foram sequenciados. Após alinhamento e edição dos dados brutos, uma sequência de nucleotídeos de cerca de 1,1 kb de base foi obtida (Figura 3). Esta região compreende, junto com aquela publicada por Souza *et al.* (1991), todo o gene *nifB* de *H. seropedicae* (aproximadamente 1,5 kb).

A comparação da sequência de aminoácidos obtida da sequência de nucleotídeos com o banco de dados de sequência (Genbank) mostrou que a proteína NifB de *H. seropedicae* possui uma identidade de 62% com a de *B. japonicum*; 57% de *R. capsulatus* 47% com a de *K. pneumoniae* (Tabela 2).

Na Figura 4 a comparação das sequências das proteínas NifB de *H. seropedicae*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Klebsiella pneumoniae* é mostrada. É importante destacar que a região **CNIQCNYCNRKYDC**, que corresponde a um provável sítio de ligação de metal, é bastante conservada nestes microrganismos.

A região do promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae* já havia sido descrita por Souza *et al.* (1991) e compreende uma sequência potencial de promotor -24/-12, dois prováveis sítios de ligação para NifA e um provável sítio de ligação de IHF.

FIGURA 3. Sequência de nucleotídeos do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

```

CCTTCTCCTTCTCCACTGCGTCAGGCTCATTGCGGCGCGCTCAATTGCAGGCGCCGGCCC
    3310      3320      3330      3340      3350      3360

GTGCTGCATTGTCGTGTTTCATGACAAGCGCCACCCACAATGTATCGCCGATTGTCGCTAT
    3370      3380      3390      3400      3410      3420

CCTCACATCGCCGTACGACGCAATTCTCCGCTATGTCATTGAATTGATTGATTATTTTGT
    3430      3440      3450      3460      3470      3480

CTGGCACGGTTTTGGCTTATGTCCTCAGGAGAAGGCCAGGCATCACTTTCCTGAAAGGGA
    3490      3500      3510      3520      3530      3540

      M  Q  P  T  Q  Y  V  G  I  Q  D  I  K  S  L  G  T  L
CTATCCATGCAGCCCACACAATACGTCGGTATCCAGGACATCAAATCGCTAGGCACCTTG
    3550      3560      3570      3580      3590      3600

      L  D  K  V  A  E  H  K  G  C  G  T  S  S  E  G  G  K  A  S
CTGGACAAGGTAGCCGAACACAAAGGCTGTGGCACCAGCAGTGAAGGCGGCAAAGCCAGT
    3610      3620      3630      3640      3650      3660

      C  G  S  S  D  G  P  A  D  M  A  P  E  V  W  E  K  V  K  N
TGCGGTTTCATCCGATGGTCCCCGCCGACATGGCGCCGAGGTTTGGGAAAAGGTCAAGAAC
    3670      3680      3690      3700      3710      3720

```

H P C Y S E E A H H H Y A R M H V A V A
 CATCCCTGCTACAGCGAAGAGGCTCATCACCCTATGCGCGTATGCACGTGGCGGTGGCA
 3730 3740 3750 3760 3770 3780

P A C N I Q C N Y C N R K Y D C A N E S
 CCGGCCTGTAACATCCAGTGCAACTACTGCAACCGCAAATACGATTGCGCCAACGAGTCG
 3790 3800 3810 3820 3830 3840

R P G V V S E K L T P E Q A A K K V F A
 CGTCCAGGCGTGGTCAGCGAAAAGCTCACGCCCGAACAAGCGGCCAAGAAGGTCTTTGCG
 3850 3860 3870 3880 3890 3900

V A S T I P Q M T V L G I A G P G D P L
 GTGGCCTCGACCATTCGCGAGATGACGGTGCTGGGCATTGCCGGTCTTGGCGACCCGCTG
 3910 3920 3930 3940 3950 3960

A N P A K T F K T F E L I S Q T A P D I
 GCCAATCCGGCCAAGACCTTCAAGACCTTCGAGCTGATTTGCGAGACCGCGCCCGATATC
 3970 3980 3990 4000 4010 4020

K L C L S T N G L A L P D H I D T I A A
 AAGCTGTGCCTGTCGACCAATGGCCTGGCCTTGCTGACCACATCGATACCATTGCTGCG
 4030 4040 4050 4060 4070 4080

F N V D H V T I T T N M V D P E I G Q H
 TTTAACGTGATCACGTCAACATCACCACGAACATGGTCGATCCCGAGATCGGACAGCAC
 4090 4100 4110 4120 4130 4140

I Y P W I Y Y Q N K R W T G I D A A R I
 ATCTATCCCTGGATCTATTACCAGAACAAGCGCTGGACCGGTATCGACGCGGCCCGCATC
 4150 4160 4170 4180 4190 4200

L H E R Q M L G L E M L T A R G I L C K
 CTGCACGAACGGCAGATGCTGGGACTGGAGATGCTCACGGCGCGCGGCATCCTGTGCAAG
 4210 4220 4230 4240 4250 4260

V N S V M I P G I N D Q H L V E V N R A
 GTCAACTCGGTGATGATCCCGGGCATCAATGACCAGCATCTGGTGGAAGTCAATCGCGCC
 4270 4280 4290 4300 4310 4320

V K S R G A F L H N I M P L I S A P E H
 GTCAAGTCACGCGGTGCCTTCCTGCACAACATCATGCCGCTCATTTTCAGCGCCCCGAGCAT
 4330 4340 4350 4360 4370 4380

G T V F G L N G Q R G P S A Q E L K A L
 GGCACCGTGTTTGGCCTGAACGGCCAGCGCGGCCCCAGCGCGCAGGAGCTCAAGGCCTTG
 4390 4400 4410 4420 4430 4440

Q D A C E G E M N M M R H C R Q C R A D
 CAGGATGCCTGTGAAGGCGAGATGAACATGATGCGCCACTGCCGCCAGTGCCGCGCCGAT
 4450 4460 4470 4480 4490 4500

A V G L L G E D R S A E F T T E K I E A
 GCGGTGGGCCTGCTGGGTGAAGACCGCAGCGCCGAATTCACCACCGAAAAGATCGAGGCC
 4510 4520 4530 4540 4550 4560

M E V A Y D G A T R K A Y Q E L V E Q E
 ATGGAAGTGGCCTATGACGGCGCCACCCGCAAGGCTTACCAGGAGCTGGTGGAACAGGAA
 4570 4580 4590 4600 4610 4620

R Q A K S A A K A A E Q Q E L A Q M A D
 CGCCAGGCCAAGTCGGCCGCCAAGGCCGCCGAGCAGCAGGAGCTGGCCCAGATGGCAGAC
 4630 4640 4650 4660 4670 4680

Q S G L S L L V A V A T K G Q G R V N E
 CAGAGCGGCCTGTCCTTGCTGGTGGCGGTGGCGACCAAGGGGCAGGGACGCGTCAACGAG
 4690 4700 4710 4720 4730 4740

H F G H V S E F Q I Y E V S S A G S K F
 CACTTCGGACACGTCAGCGAATTCAGATCTATGAAGTCAGCAGCGCCGGCAGCAAGTTC
 4750 4760 4770 4780 4790 4800

V G H R R V D Q Y C Q G G Y G E E D A L
 GTCGGACACCGGCGCGTGGACCAGTACTGTCAGGGCGGCTATGGCGAGGAGGATGCACTG
 4810 4820 4830 4840 4850 4860

E T V I R A I N D C H A V L V A K I G G
 GAGACCGTCATCCGCGCCATCAACGACTGCCATGCAGTGCTGGTGGCCAAGATCGGCGGC
 4870 4880 4890 4900 4910 4920

```

C P K D D L Q K V G I E P V D R Y A H E
TGTCCCAAGGATGATCTGCAGAAGGTGGGCATCGAGCCGGTGGACCGGTATGCCCATGAA
    4930      4940      4950      4960      4970      4980

F I E Q S V I A Y F M D Y L E R V R S G
TTCATCGAGCAATCCGTCATCGCCTACTTCATGGATTACCTGGAACGCGTGCGCAGCGGA
    4990      5000      5010      5020      5030      5040

Q I E H R P R G D A D I R Q G A Y T S V
CAGATCGAGCATCGGCCACGAGGCGACGCCGATATCCGCCAGGGGGCGTATACCTCGGTG
    5050      5060      5070      5080      5090      5100

Q S
CAGTCGAC
    5110

```

A sequência obtida do fragmento *SalI* de 1,1 kb (vermelho) foi unida a sequência publicada por Souza *et al.* (1991) de 0,4 kb (preto), compondo o gene *nifB* de *H. seropedicae* e sua região promotora com aproximadamente 1,5 kb. A sequência sublinhada corresponde aos sítios de ligação da proteína NifA; a sequência sublinhada e em negrito ao promotor -24/-12; a sequência em negrito ao sítio de ligação para ribossomo. A sequência de aminoácidos da proteína NifB está representada acima da sequência de nucleotídeos do gene *nifB*.

4.2 Clonagem e Sequenciamento da Região a Jusante do Gene *nifB*

O fragmento de DNA correspondente a porção a jusante do gene *nifB* obtido pela técnica de PCR (item 3.12 de Material e Métodos), foi clonado no vetor pTZ18R, produzindo o plasmídeo pFR1. Este plasmídeo foi purificado e submetido a sequenciamento (item 3.17 de Material e Métodos). A sequência de aminoácidos deduzida da sequência de nucleotídeos do clone pFR1 apresenta 51% de identidade com aquela codificada pela ORF4 da região 3

do gene *nifX* de *Rhodobacter capsulatus* (Figura 5), mas a região C-terminal do gene *nifB* ou o gene *nifQ* não foram identificada.

TABELA 2. Similaridade e identidade da proteína NifB de *H. seropedicae* com a de proteínas homólogas de outros microrganismos.

Microrganismo	Similaridade (%)	Identidade (%)
<i>B. japonicum</i>	74	62
<i>R. capsulatus</i>	71	57
<i>K. pneumoniae</i>	61	47

A identidade foi determinada com a relação entre o número de aminoácidos conservados e o número de aminoácidos totais da proteína enquanto a similaridade é dada pela relação entre o número de aminoácidos conservados somados às substituições por aminoácidos do mesmo grupo e o número de aminoácidos totais da proteína. As sequências de aminoácidos das proteínas NifB de *K. pneumoniae*, *R. capsulatus* e *Bradyrhizobium japonicum* foram obtidas de suas sequências de nucleotídeos contidas no banco de dados de sequência (Genbank).

FIGURA 4. Comparação entre as sequência de aminoácidos das proteínas NifB de *H. seropedicae*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Klebsiella pneumoniae*.

HsnifB	MQPTQYVGIQDIKSLGTLDDKVAEHKGCSTSEGGKASCGSSDGPADMAPEVWEKVNHP
BjnifB	-----MQSITEHKGCRAAKTGRARLRQAGRGDLPVEIWERVKNHP
KpnifB	-----MTSCSSFS--GGKACRPADDS--ALTPLVADKAAAHF
	* . . * . * **
HsnifB	CYSEEAAHHHYARMHVAVAPACNIQCNYCNRKDYDCANESRPGVVSEKLTPEQAAKKVFVA
BjnifB	CYSEDAHHHYARMHVAVAPACNIQCNYCNRKDYDCANESRPGVVSEKLTPEQAVRKVI
KpnifB	CYSRHGHHRFARMHLPVAPACNIQCNYCNRKFDCSNESRPGVSSSTLLTPEQAVVKVRQ
	*** ** . . **** . ***** . ***** . ** . ***** * ***** ** **
HsnifB	STIPQMTVLGIAGPGDPLANPAKTFKTFELISQTAPDIKLCSTNGLALPDHIDTIAAFN
BjnifB	TTIPQMTVLGIAGPADALANPAKTFKTLALVTEAAPDIKLCSTNGLALPDYVDTIVRAK
KpnifB	QAIPQLSVVGIAGPGDPLANIAARTFRTLELIREQPLDKLCSTNGLVLPDAVDRLLDVG
	. *** . . * . ***** * * * * * . * . * . * . ***** * * * . * .
HsnifB	VDHVTITTNMVDPEIGQHIYPWIYYQNKRTGIDAARILHERQMLGLEMLTARGILCKVN
BjnifB	VDHVTITINMVDPEIGAKIYPWIFFNHKRYTGIEAARILTNRQLQGLEMLSERGILCKIN
KpnifB	VDHVTVTINTLDAEIAAQIYAWLWLDGERYSGREAGEILARQLEGVRRRLTAKGVLVKIN
	***** . * * . * * * . * * * . * . * . * * * * . * . * . * . * . *
HsnifB	SVMIPGINDQHLVEVNRVAVKSRGAFLHNIMPLISAPHEGTVFGLNGQRPQSAQELKALQD
BjnifB	SVMIPNINDDHLVEVNKAVTSRGAFLHNIMPLISVPEHGTAFLNGQRPQTAQELKTLQD
KpnifB	SVLIPGINDSGMAGVSRALRASGAFIHNIMPLIARPEHGTVFGLNGQPEPDAETLAATRS
	** . ** . *** . * . * . . *** . ***** . ***** ***** * * . * . .
HsnifB	ACEGEMNMRHRCRQCRADAVGLLGEDRSAEFTTEKIEAMEVAYDGATRKAQELVEQERQ
BjnifB	ACEGKINMRHCGSA--ADAVGLLGEDRSAEFTNDQVMKMDVHYDLEMRKAYQKRVENERV
KpnifB	RCGEVMPQMTCHQCRADAI GMLGEDRSQOFTQLPAPESLPAWLPI LHQRAQLHAS----
	* . * * * . * * . * . * * . ***** . * * . . . *
HsnifB	AKSAAKAAEQQELAQMADQSGLSLLVAVATKGQGRVNEHFHGVSEFQIYEVSSAGSKFVG
BjnifB	SKVAAGQKE--LAGVSGEMSAITVLVAVATKGSGLINEHFHGAKEFQLYELSTSGAKFVG
KpnifB	---IATRGE-----SE--ADDACLVAVASSRGDVIDCHF GHADRFYIYSLSAAGMVLVN
	* * . . ***** . ***** * . * . * . * . *
HsnifB	HRRVDQYCQGGYGEE--D---ALETVIRAINDCHAVLVAKIGGCPKDDLQKVGIEPVDRY
BjnifB	LRRVEGYCQAGYGEE--D---RLSVIMRDIRDCHAVFVAKIGGCPKSGLIKAGIEPVDQF
KpnifB	ERFTPKYCQGRDDCEPDNAARFAAILELLADV KAVFCVRIGHTPWQOLEQEGIEPCVDG
	* *** * * . . . * . * * . * * . * . *****
HsnifB	AHEFIEQSVIAYFMDYLERVRSQIEHRPRGDADIRQGAITSVQST
BjnifB	AYEYIEKSTIAWFRAYVGKVRGEIQHVQRGVPPRWPGDRISAA--
KpnifB	AWRPVSEVLPAWWQQRRGSWP--AALPH--KGVA-----

As sequências de aminoácidos foram deduzidas da sequência de nucleotídeos dos gene *nifB* e alinhadas. Em azul está destacado a região conservada que constitui um provável sítio de ligação a metal.

FIGURA 5. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da sequência de nucleotídeos obtida do plasmídeo pFR1 com a da *orf4* de *Rhodobacter capsulatus* da região do gene *nifX*.

Hs	3	ELIKQWRAQDTHGAWDGKSNADLLAPYII	
		+L+ RA+D+HG WD K+N+++L +I+	
Rc	21	QLVAVIRAEDSHGLWDDKTNSEILREFIV	
Hs		TREQRREIPIIGDPDPEXLWRLELFYN	170
		T E+RR +PIIGDPDPE +WR+ FY+	
Rc		TAEERRSMPIIGDPDPELIWRMTKFYD	76

Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida da sequência de nucleotídeos do clone pFR1 obtido por PCR com a da *orf4* de *Rhodobacter capsulatus* da região do gene *nifX*.

4.3 Estudo da Regulação do Gene *nifB* de *H. seropedicae*

Os ensaios fisiológicos foram realizados através da determinação da atividade de β -galactosidase de estirpes de *H. seropedicae* e *E. coli* contendo fusões *nifB::lacZ*.

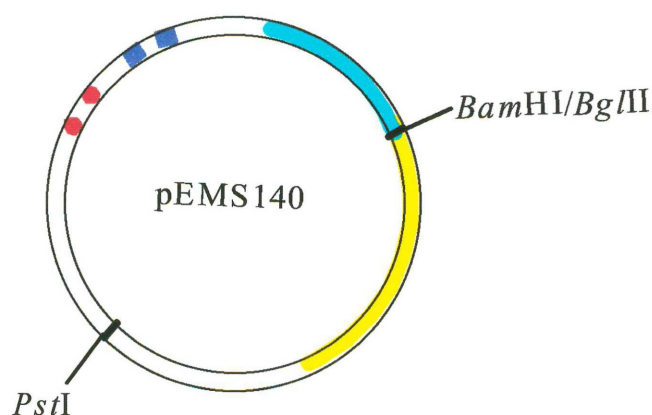
4.3.1 Regulação do Promotor *nifB* em Fusão Plasmidial

O fragmento *Pst*I-*Bam*HI do plasmídeo pEMS300A (SOUZA *et al.*, 1991) foi clonado no vetor de fusão *lacZ* pPW452 produzindo o plasmídeo pEMS140. Neste plasmídeo toda a região promotora do gene *nifB* está presente (Figura 6).

4.3.1.1 Estudo da Regulação do Gene *nifB* de *H. seropedicae* em Estirpes de *E. coli*

As estirpes de *E. coli* utilizadas foram a TH1 (*rpoN*) e ET8894 (*ntrC*), contendo o plasmídeo pEMS140 (fusão *nifB::lacZ*). Quando estas estirpes foram crescidas em meio mínimo na presença ou ausência de cloreto de amônio os níveis de β -galactosidase foram muito baixos. O plasmídeo pMC71A (expressa o gene *nifA* de *K. pneumoniae* constitutivamente) introduzido nas estirpes contendo a fusão *nifB::lacZ*, provocou um aumento de 35 vezes na atividade de β -galactosidase quando a fusão estava na estirpe ET8894 mas não na estirpe TH1 (Tabela 3). O atividade de β -galactosidase da estirpe ET8894 (pEMS140/pMC71A) independeu da presença ou ausência de cloreto de amônio no meio de cultura.

FIGURA 6. Representação esquemática do plasmídeo pEMS140



O plasmídeo pEMS140 possui o fragmento *Sal* I/*Pst* I de 0,9 kb clonado no vetor pPW452. O sítio de ligação para NifA está representado em lilás, o promotor -24/-12 em vermelho, a região codificadora do gene *nifB* em azul claro e o gene *lacZ* em amarelo.

4.3.1.2 Estudo da Regulação do Gene *nifB* de *H. seropedicae* em Estirpes de *H. seropedicae*

O plasmídeo pEMS140 foi introduzido por conjugação nas estirpes selvagem SmR1 e mutante *nifA*⁻ (SmR54) de *H. seropedicae* e os ensaios foram conduzidos em condições de fixação de nitrogênio ou não, isto é, presença ou ausência de íons amônio e baixa ou alta

tensão de oxigênio. Sob condições de fixação de nitrogênio, os níveis de β -galactosidase da estirpe SmR1 (pEMS140) foram cerca de vinte vezes superiores àqueles obtidos em condições de repressão (presença de íons amônio) (Tabela 4), sugerindo que o gene *nifB* só é expresso em condições de baixos níveis de íons amônio e oxigênio. Quando a mesma fusão *nifB::lacZ* foi testada na estirpe *nifA*⁻ não houve ativação da expressão do gene *nifB* na ausência de NH₄Cl e 1,5% de oxigênio (Tabela 4).

4.3.2 Regulação do Promotor *nifB* em Fusões Cromossomais em *H. seropedicae*

A estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* SmR2126 contém uma fusão cromossomal *nifB::lacZ* e foi construída conjugando a estirpe SmR1 com o plasmídeo pEMS110 seguida de seleção em meio NFbHPN contendo tetraciclina e estreptomicina. O plasmídeo pEMS110 (SOUZA, 1991) contém o transposon Tn5-21 inserido no gene *nifB* e o gene *lacZ* (desprovido de seu promotor) do transposon está na mesma orientação de transcrição que o gene *nifB*. Quando a expressão do gene *nifB* foi investigada utilizando esta estirpe, os níveis de β -galactosidase foram reprimidos em mais de 95% na presença de 20 mmol/L de NH₄Cl e/ou 20% de oxigênio (Tabela 5). Novamente os resultados demonstram a regulação do promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae* pelo produto do gene *nifA* e pelos níveis de íons amônio e tensão de oxigênio.

A estirpe SmR2126/1 foi construída a partir de SmR2126 pela introdução do cassete contendo o gene de resistência a canamicina no gene *nifA*, produzindo o genótipo

nifB::lacZ, *nifA::Km*. Nesta estirpe o promotor do gene *nifB* não foi ativado em qualquer das condições testadas (Tabela 5).

TABELA 3. Expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae* em estirpes de *E. coli*.

Estirpe	Plasmídeo	Atividade de β -alactosidase (Unidades Miller)	
		- NH_4^+	+ NH_4^+
TH1 (<i>rpoN</i> ⁻)	-	0 (0)	0 (0)
TH1	pEMS140	1 (1)	1 (1)
TH1	pEMS140/pMC71A	1 (2)	0 (0)
ET8894	-	0 (0)	3 (1)
ET8894	pEMS140	5 (0)	7 (7)
ET8894	pEMS140/pMC71A	179 (20)	195 (20)

Valores obtidos nos ensaios de β -galactosidase em estirpes. TH1 (*rpoN*⁻) e ET8894 ($\Delta\text{glnAntrBCrpoN}^+$) de *E. coli* na ausência e na presença dos plasmídeos pEMS140 (*nifB::lacZ*) e pMC71A (NifA de *K. pneumoniae* expresso constitutivamente). - NH_4^+ , culturas crescidas na presença serina 100 $\mu\text{g/ml}$; + NH_4^+ , culturas crescidas na presença de NH_4Cl (20 mmol/L). As determinações foram realizadas como descrito no item 3.24.1 de Material e Métodos. Os valores numéricos correspondem a média de pelo menos três ensaios e entre parênteses estão os valores de desvio-padrão.

TABELA 4. Efeito do oxigênio e íons amônio sobre a expressão do gene *nifB* em *H. seropedicae* a partir de fusão plasmidial.

Estirpes	Plasmídeos	Atividade de β - galactosidase (Unidades Miller)			
		- NH ₄ ⁺	- NH ₄ ⁺	+ NH ₄ ⁺	+ NH ₄ ⁺
		20% O ₂	1,5% O ₂	20% O ₂	1,5% O ₂
SmR1	-	2 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (2)
SmR1	pEMS140	18 (4)	208 (46)	3 (2)	11 (5)
SmR1	pPW452	16 (1)	32,1 (4)	40 (0)	48 (14)
SmR54	-	2 (2)	4,5 (3)	1 (0)	3 (1)
SmR54	pEMS140	12 (1)	8,9 (2)	5 (2)	11 (2)
SmR54	pPW452	5 (3)	13,3 (10)	12 (2)	22 (3)

Valores obtidos nos ensaios de β -galactosidase em estirpes de *H. seropedicae* SmR1 (selvagem) e SmR54 (*nifA*⁻) e contendo a fusão plasmidial (pEMS140; *nifB*::*lacZ*). - NH₄⁺, culturas crescidas na ausência de NH₄Cl; + NH₄⁺, culturas crescidas na presença de NH₄Cl (20 mmol/L). As determinações foram realizadas como descrito no item 3..24.1 de Material e Métodos. Os valores numéricos correspondem a média de pelo menos três ensaios e entre parênteses estão indicados os valores de desvio-padrão.

TABELA 5. Expressão do gene *nifB* em *H. seropedicae* é dependente da proteína NifA.

ESTIRPE	Atividade de β -galactosidase (Unidades Miller)			
	- NH ₄ ⁺	- NH ₄ ⁺	+ NH ₄ ⁺	- NH ₄ ⁺
	20% O ₂	1,5% O ₂	20% O ₂	1,5% O ₂
SmR2126	0 (0)	550(156)	25 (22)	4 (6)
SmR2126/1	37 (10)	17 (5,1)	12 (12)	19 (2)

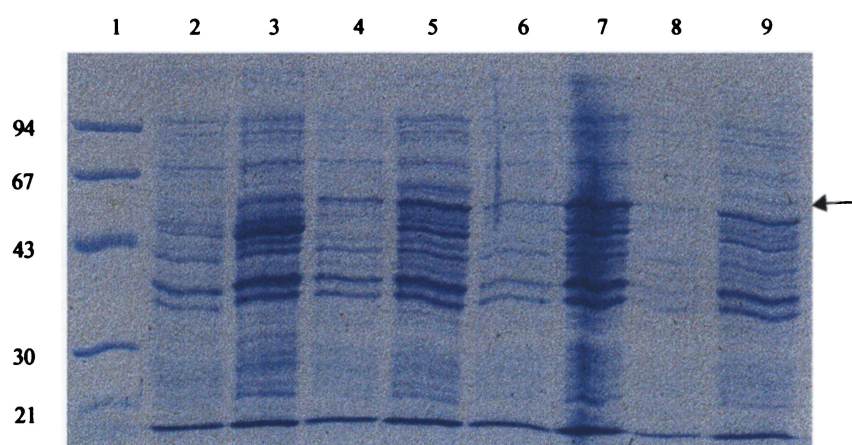
Valores obtidos nos ensaios de β -galactosidase nas estirpes de *H. seropedica* SmR2126 (fusão *nifB::lacZ*) e SmR2126/1(*nifA::Km* e *nifB::lacZ*). - NH₄⁺, culturas crescidas na ausência de NH₄Cl; + NH₄⁺, culturas crescidas na presença de NH₄Cl (20 mmol/L). As determinações foram realizadas como descrito no item 3.24.1 de Material e Métodos. Os valores numéricos correspondem a média de pelo menos três ensaios e entre parênteses estão os valores de desvio-padrão.

4.4 Superexpressão e Purificação Parcial da Proteína NifA de *K. pneumoniae*

A proteína NifA de *K. pneumoniae* foi superexpressa e parcialmente purificada a partir das estirpes de *E. coli* TH1 (*rpoN*) e ET8894 (*ntrC*) contendo o plasmídeo pNH11. O plasmídeo pNH11 contém o gene *nifA* de *K. pneumoniae* clonado sob controle do promotor *tac*, induzido por IPTG (0,1-1 mmol/L). A Figura 7 mostra o eletroforetograma em gel de poliacrilamida (10%) na presença de SDS (PAGE-SDS) antes e após indução com IPTG. A eletroforese revelou a presença de uma nova banda de proteína com uma

massa molecular de aproximadamente 60 kDa nas estirpes contendo pNH11 e induzidas com IPTG.

FIGURA 7. Eletroforetograma de proteínas em gel de SDS-PAGE dos extratos livre de células das estirpes de *E. coli* expressando a proteína NifA de *K. pneumoniae*.



As estirpes de *E. coli* TH1 (*rpoN*) e ET8894 (*rpoN*⁺) contendo ou não o plasmídeo pNH11 (expressa a proteína NifA de *K. pneumoniae* a partir do promotor *tac*) foram crescidas em meio LB e induzidas com IPTG, conforme o item 3.19 (Material e Métodos).

1. Marcador de massa molecular
2. Extrato de TH1
3. Extrato de TH1 induzida com IPTG
4. Extrato de TH1 (pNH11)
5. Extrato de TH1 (pNH11) induzida com IPTG
6. Extrato de ET8894
7. Extrato de ET8894 induzida com IPTG
8. Extrato de ET8894 (pNH11)
9. Extrato de ET8894 (pNH11) induzida com IPTG

4.5 Superexpressão da Proteína RpoN de *K. pneumoniae*

A proteína RpoN foi superexpressa em *E. coli* TH1 contendo o plasmídeo pWVC93025. A Figura 8 mostra o eletroforetograma em PAGE-SDS das proteínas totais desta estirpe antes e após indução com IPTG. Uma banda de massa molecular aproximada de 72 kDa, correspondente a RpoN, pode ser visualizada após indução.

4.6 Purificação da Proteína RpoN *K. pneumoniae*

A proteína RpoN de *K. pneumoniae* foi purificada utilizando o método de Hunt & Magasanik (1985) modificado. As modificações realizadas no processo de purificação da proteína RpoN consistiram na utilização de Triton X-100 como agente solubilizante e na substituição, na etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular, da coluna AcA44 (LKB) pela superose 12HR. Quando as células foram lisadas no tampão sugerido por Hunt & Magasanik (1985) a proteína RpoN permaneceu no precipitado. Após a adição de Triton X-100 (0,1%) a maior parte da proteína passou ao sobrenadante (dados não mostrados).

4.6.1 Cromatografia em Coluna de DEAE-Cellulose

A amostra (17 mL) contendo 97 mg de proteína foi aplicada em coluna de DEAE-Cellulose para eliminar o DNA presente. Uma vez que a proteína RpoN não se liga a resina quando a concentração de NaCl for 350 mM (HUNT & MAGASANIK, 1985), mas o DNA ainda está ligado em 500 mM de NaCl, foi possível reter o DNA na resina e coletar a proteína no eluato da coluna. O eluato (35 mL) foi precipitado com 30% de sulfato de amônio e o sobrenadante foi precipitado com 60% de sulfato de amônio. O precipitado, contendo a proteína RpoN, foi dissolvida em 12,5 mL de tampão A.

4.6.2 Cromatografia em Coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow

Sessenta e duas miligramas de proteína total foi aplicada na coluna e 12 mg foi recuperada nas frações 305 a 360 (NaCl 0,42-0,47 mol/L), que continha a banda correspondente a proteína RpoN. A proteína RpoN devido a presença de um domínio altamente ácido, liga-se muito mais fortemente a DEAE que a maioria das proteínas de *E. coli* (HUNT & MAGASANIK, 1985 e FISHER, 1994).

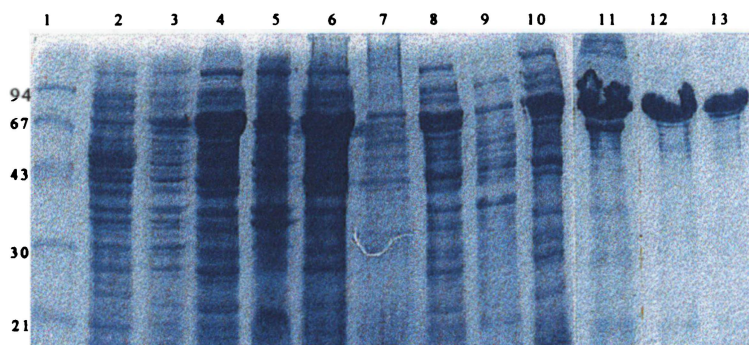
4.6.3 Cromatografia em Superose 12

A amostra contendo 12 mg de proteína sofreu a última etapa de purificação ao ser eluída na coluna Superose 12 HR 10/30. As frações 47 a 53 (3,5 mL) foram coletadas e submetidas a eletroforese em PAGE-SDS. Após esta etapa de purificação foi obtida uma proteína pura o suficiente para a realização do ensaio de retardamento em gel. As frações 52 e 53 foram utilizadas nos ensaios e continham 500 µg e 350 µg de proteína total, respectivamente.

A purificação parcial da proteína RpoN foi realizada a partir de 97 mg de proteína solúvel na extrato bruto e 3 mg de RpoN foram obtidos com uma pureza aproximada de 80%.

A Figura 8 mostra a purificação gradativa da proteína durante as várias etapas de purificação que foi submetida. Na Tabela 6 estão representados as concentrações de proteínas nas principais etapas de purificação e o grau de pureza obtido por densitometria.

FIGURA 8. Eletroforetograma de proteínas em gel de SDS-PAGE das etapas de purificação da proteína RpoN.



Alíquotas (20 μ L) das frações obtidas durante cada etapa de purificação da proteína RpoN foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE (10%) e as proteínas foram coradas com coomassie blue (Material e métodos ítem 2.21).

1. Marcador de massa molecular
2. Extrato livre de células de TH1 (pWVC93025).
3. Extrato livre de células de TH1 (pWVC93025) induzido com IPTG.
4. Sobrenadante do lisado.
5. Precipitado do lisado.
6. Frações reunidas do eluato da coluna de DEAECellulose
7. Precipitado das frações reunidas da coluna de DEAE-Cellulose após precipitação com sulfato de amônio 30%
8. Sobrenadante das frações reunidas da coluna de DEAE-Cellulose após precipitação com sulfato de amônio 30%
9. Sobrenadante das frações reunidas da coluna de DEAE-Cellulose após precipitação com sulfato de amônio 30-60%
10. Precipitado das frações reunidas da coluna de DEAE-Cellulose após precipitação com sulfato de amônio 30-60%
11. Frações reunidas (305-360) da coluna de DEAE-sepharose.
12. Fração 52 da coluna Superose 12
13. Fração 53 da coluna Superose 12

TABELA 6. Tabela de purificação da proteína RpoN.

Etapas de purificação	Volume de Amostra (ml)	Proteína Total (mg)	Concentração de proteína (mg/ml)
Lisado	17	97	5,7
Eluato da coluna de DEAE-Cellulose	35	66	1,9
Precipitação com sulfato de amônio	12,5	56	4,5
Eluato da coluna de DEAE-Sephrose	14,6	12	0,96
Eluato da coluna de Superose-12	3,5	3	0,85 *

* A percentagem de pureza da proteína RpoN foi determinada por densitometria e correspondeu a 80%

4.7 Ensaio de Retardamento Eletroforético do Promotor *nifB* pela NifA ou RpoN

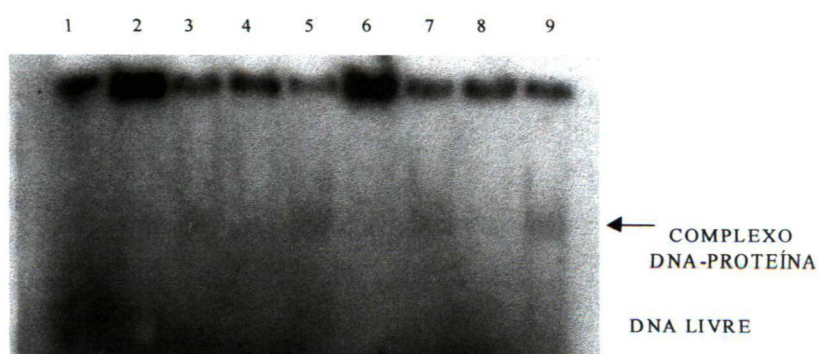
4.7.1 Ensaio de Retardamento Eletroforético do Complexo Promotor *nifB*-proteína NifA

Neste ensaio foi possível verificar a presença de complexo DNA-proteína quando extratos parcialmente purificados das estirpes contendo o plasmídeo pNH11 foram testadas

contra o promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae* marcado radioativamente (Figura 9). A ligação da proteína ao DNA foi detectada mesmo na presença de alta concentração de DNA de timo, o que sugere ligação específica DNA-proteína. Entretanto, também foi possível detectar a formação de complexo entre proteína e DNA quando foi utilizado extrato da estirpe ET8894 (*ntrC*) que não continha o plasmídeo pNH11. Este resultado sugere a interação do promotor *nifB* com a proteína RpoN, uma vez que não ocorreu com a estirpe TH1 (*rpoN*).

4.7.2 Ensaio de Retardamento em Gel do Complexo Promotor *nifB*-proteína RpoN

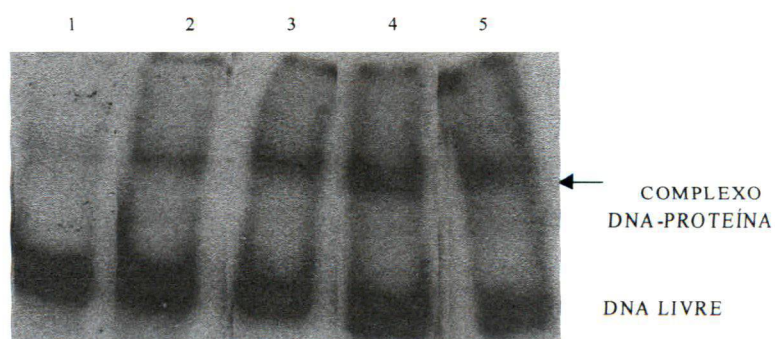
A proteína RpoN purificada foi capaz de se ligar com a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*. A Figura 10 mostra que quando a concentração de RpoN aumenta de 0,9 μmol a 9 μmol a intensidade da banda do complexo RpoN-DNA também aumenta. Quando o fragmento contendo o promotor *nifB* não marcado foi adicionado ao sistema, a banda do complexo não foi visualizado (Figura 11).

FIGURA 9. Ensaio de retardamento em gel do complexo promotor *nifB*-proteína NifA

Extratos livre (20 μ g) de células das estirpes TH1 (*rpoN*) e ET8894 (Δ *glnAntrBC*, *rpoN*⁺) contendo ou não o plasmídeo pNH11 (expressa a proteína NifA de *K. pneumoniae*) foram adicionados ao fragmento de 280 pares de base contendo o promotor *nifB* marcado radiativamente na presença ou ausência de 1 μ g de DNA de timo de bezerro (item 3.22 de Material e Métodos).

1. Nenhuma proteína adicionada
2. Extrato livre de células TH1 e DNA de timo
3. Extrato livre de células TH1 (pNH11) e DNA de timo
4. Extrato livre de células ET8894 e DNA de timo
5. Extrato livre de células ET8894 (pNH11) e DNA de timo
6. Extrato livre de células TH1
7. Extrato livre de células TH1 (pNH11)
8. Extrato livre de células ET8894
9. Extrato livre de células ET8894 (pNH11)

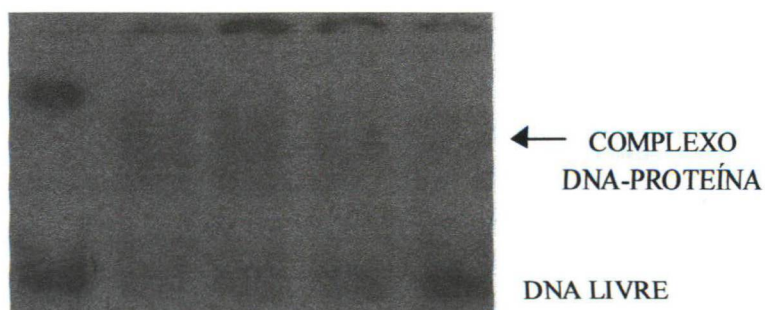
FIGURA 10. Efeito da concentração da proteína RpoN na formação do complexo promotor *nifB*-RpoN .



A proteína RpoN de *K. pneumoniae* parcialmente purificada foi adicionada ao fragmento de 280 pares de base contendo o promotor *nifB* marcado radiativamente (item 2.22 de Material e Métodos).

1. Nenhuma proteína adicionada
2. 1 µg de proteína RpoN
3. 3 µg de proteína RpoN
4. 6 µg de proteína RpoN
5. 10 µg de proteína RpoN

FIGURA 11. Efeito do DNA competidor homólogo na formação do complexo promotor *nifB*-RpoN .



A proteína RpoN de *K. pneumoniae* parcialmente purificada (10 μ g) foi adicionada ao fragmento de 280 pares de base contendo o promotor *nifB* marcado radiativamente e, quando indicado, DNA competidor homólogo não marcado (item 2.22 de Material e Métodos).

1. Nenhuma proteína adicionada
2. Proteína RpoN
3. Proteína RpoN e DNA competidor frio (6,66 ng)
4. Proteína RpoN e DNA competidor frio (66,6 ng)
5. Proteína RpoN e DNA competidor frio (666 ng)

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi determinada a sequência do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* e estudada a regulação de seu promotor através de fusões cromossomais e plasmidial em *H. seropedicae* e *E. coli*.

Analisando a sequência de aminoácidos (SOUZA *et al.*, 1991b) que codificava parte do gene *nifB*, foi verificada a presença de duas regiões consenso para sítio de ligação para a proteína NifA e um sítio característico de ligação para o fator alternativo σ^N da RNA polimerase. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae* é dependente da proteína ativadora NifA e da holoenzima RNA polimerase- σ^N . Porém, nenhuma evidência fisiológica ou genética foi apresentada para comprovar esta hipótese.

Inicialmente a expressão do promotor *nifB* foi ensaiada em estirpes de *Escherichia coli* contendo a fusão plasmidial *nifB::lacZ* (plasmídio pEMS140) na presença e ausência da proteína NifA (expressa constitutivamente do plasmídeo pMC71A) sob condições limitantes ou de excesso de nitrogênio fixado. Duas estirpes de *E. coli* mutantes foram utilizadas nos ensaios: a estirpe ET8894, mutante $\Delta glnAntrBC$, foi escolhida para evitar a eventual ativação do promotor -24/-12 pela proteína ativadora NtrC; e a estirpe TH1, mutante *rpoN*, para testar a necessidade do fator σ^N na expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae*. A estirpe ET8894 (pEMS140) apresentou níveis basais de β -galactosidase, mas quando esta estirpe foi transformada com o plasmídeo pMC71A a atividade aumentou significativamente, indicando que o gene *nifB* de *H. seropedicae* é ativado pela proteína

NifA. Por outro lado, na estirpe TH1 os níveis foram muito baixos em qualquer das situações testadas, indicando que a expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae* não ocorre em estirpes mutantes *rpoN* e que o gene *nifB* é transcrito exclusivamente pelo promotor RpoN-dependente. O nível de expressão do gene *nifB* na estirpe ET8894 (pEMS140 pMC71A) foi independente da presença de íons amônio. Isto ocorreu porque o gene *nifA* de *K. pneumoniae* é expresso constitutivamente a partir do promotor *tet* do plasmídeo pMC71A e esta proteína NifA não é sensível a íons amônio (BUCHANAN-WOLLASTON *et al.*, 1981; FISCHER, 1994).

Quando o plasmídeo pEMS140 foi introduzido nas estirpes de *H. seropedicae* selvagem e *nifA*⁻, a expressão do gene *nifB* foi observada apenas na estirpe SmR1 (selvagem) desreprimida em 1,5% de oxigênio e na ausência de íons amônio. Perfil de expressão semelhante foi encontrado na estirpe SmR2126 (com a fusão cromossomal *nifB::lacZ*). Altas concentrações de NH₄Cl (20 mmol/L) ou oxigênio (20%) reprimiram a expressão do gene *nifB*. Por outro lado, na estirpe SmR54 o gene *nifB* não foi expresso em nenhuma das condições testadas, indicando novamente o requerimento da proteína NifA para expressão do gene *nifB*.

Apesar do gene *nifA* de *H. seropedicae* ser expresso na estirpe selvagem na presença de ar (20% de oxigênio) (PEDROSA *et al.*, 1997) o gene *nifB* não foi expresso na ausência de NH₄Cl e presença de ar. Este resultado pode ser explicado pela sensibilidade da própria proteína NifA de *H. seropedicae* a altos níveis de íons amônio (PEDROSA *et al.*, 1997). O controle da atividade da proteína NifA pelos níveis de nitrogênio fixado aparentemente ocorre via proteína PII (BENELLI *et al.*, 1997). Além disto a proteína NifA de *H. seropedicae* é diretamente regulada por oxigênio (SOUZA *et al.*, 1991b; PEDROSA,

1997) como ocorre com aquelas de *R. meliloti*, *B. japonicum* e *R. leguminosarum* (FISCHER, 1994) em contraste com a de *K. pneumoniae* (FISCHER, 1994).

Para estudar a interação entre a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* com as proteínas NifA e RpoN, estas proteínas de *K. pneumoniae* foram parcialmente purificadas e ensaios de ligação *in vitro* foram realizados.

Nos ensaios de ligação com a proteína NifA foi utilizado extrato livre de células de duas estirpes de *E. coli*, uma RpoN⁺ (ET8894) e outra RpoN⁻ (TH1) contendo ou não o plasmídeo superexpressando a proteína NifA de *K. pneumoniae* (pNH11). Os ácidos nucleicos foram removidos por tratamento com sulfato de estreptomicina e as proteínas foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio. Os ensaios de ligação foram realizados pelo método de retardamento em gel. Uma banda contendo o DNA marcado e de menor velocidade de migração foi identificada quando estavam presentes as proteínas extraídas das estirpes de *E. coli* contendo plasmídeo pNH11. O mesmo resultado foi obtido quando DNA de timo de bezerro (DNA competidor heterólogo) foi adicionado. Estes resultados sugerem que a sequência de ligação para a proteína NifA presente no promotor *nifB* é fisiologicamente ativa. Por outro lado, proteínas da estirpe ET8894, mas não da estirpe TH1, também foram capazes de se ligar fracamente ao promotor do gene *nifB*. Este resultado pode ser devido a presença do fator σ^N em ET8894.

Para verificar se o fator σ^N era capaz de se ligar especificamente ao promotor do gene *nifB*, a proteína RpoN (σ^N) de *K. pneumoniae* foi purificada (pureza aproximada de 80%) e utilizada em ensaios de retardamento em gel com o promotor do gene *nifB* marcado radiativamente.

Uma banda de retardamento foi claramente visível na presença do fator σ^N e desapareceu quando DNA competidor homólogo foi adicionado ao sistema, indicando ligação específica com o promotor *nifB* de *H. seropedicae*.

Os estudos de expressão do gene *nifB* de *H. seropedicae* *in vivo* e ligação de proteínas *in vitro* juntos indicam fortemente que a expressão deste gene é dependente da proteína NifA e requer o fator σ^N .

O fragmento de DNA *SalI* de 1,1 Kb contido no plasmídio pEMS304 (SOUZA *et al.*, 1991) foi completamente sequenciado. A análise deste fragmento mostrou uma única região codificadora de proteínas cujo produto apresentou uma identidade de 47 a 62% com a proteína NifB de outros organismos. Aquele fragmento, isolado do plasmídeo pEMS1, é contíguo ao fragmento de 2,1 Kb que contém os primeiros 162 codons do gene *nifB*. A união da sequência obtida por Souza *et al.*, (1991) com a obtida aqui permitiu a determinação da quase totalidade da sequência do gene *nifB* de *H. seropedicae*. A sequência de aminoácidos da proteína NifB de *H. seropedicae* possui o agrupamento de cisteínas característico de proteína NifB: C-X₃-C-X₂-C-X₅-C. Este agrupamento é similar àqueles de proteínas que contém grupos Fe-S (BUIKEMA *et al.*, 1987) e presumivelmente ligam um grupo Fe-S quando a proteína NifB se encontra na forma de NifB-co.

Nenhum codon de parada de leitura foi identificado na sequência obtida, indicando que este gene não está completo. Porém, a comparação da sequência de aminoácidos e do tamanho da proteína NifB de *H. seropedicae* deduzida desta sequência (522 aminoácidos) com a de outros organismos (*Klebsiella pneumoniae*, 468; *Bradyrhizobium japonicum*, 498) sugere que o codon de parada deve estar muito próximo do final da região sequenciada. Outra possibilidade é um possível erro de leitura de base, causando a eliminação do codon de parada.

Com o objetivo de isolar e sequenciar a região a jusante do gene *nifB*, incluindo os últimos codons, um "primer" complementar a região final sequenciada do gene *nifB* foi construído ("primer" *nifB1*) e utilizado numa reação de amplificação de DNA em cadeia (PCR) (PARK *et al.*, 1996). O DNA total (cromossomal) de *H. seropedicae* foi utilizado na primeira PCR. Nesta etapa foi produzido um DNA de fita simples, pois só um "primer" foi utilizado. O produto desta reação foi utilizado numa segunda reação de PCR utilizando o "primer" *nifB1* e o "primer" universal. Esta etapa foi feita em baixa estringência, permitindo que o "primer" universal se ligasse inespecificamente a uma região a jusante do "primer" *nifB1*. O produto de amplificação de 1,2 Kb foi clonado (plasmídeo pFR1) e parcialmente sequenciado. A análise da sequência de aminoácidos deduzida desta sequência de nucleotídeos mostrou uma proteína que apresentou 51% de identidade com aquela codificada pela ORF4 da região do gene *nifX* de *R. capsulatus*. Além disto, a sequência de nucleotídeos foi idêntica aquela obtida por Klassen (1997, comunicação pessoal) da região dos genes *nifEN* de *H. seropedicae*. De fato, o gene *nifX* de *Rhodobacter capsulatus* possui uma região homóloga à região C-terminal do gene *nifB* e está localizado adjacente aos genes *nifEN* (MORENO-VIVIAN *et al.*, 1989). Aparentemente, o gene *nifX* de *H. seropedicae* também possui região homóloga ao *nifB*, permitindo que o "primer" hibridizasse e a TaqDNA polimerase amplificasse a região do gene *nifX* e não a do *nifB*.

6 CONCLUSÕES

1. A expressão do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* é ativada pela proteína NifA.
2. A expressão do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* requer o fator sigma alternativo σ^N (RpoN, σ^{54}).
3. O promotor do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* interage especificamente com as proteínas NifA e RpoN.
4. A proteína NifB de *Herbaspirillum seropedicae* é altamente similar às proteínas de *Bradyrhizobium japonicum* (62%), *Rhodobacter capsulatus* (57%) e *Klebsiella pneumoniae* (47%), especialmente na região N-terminal no agrupamento de cisteínas C-X₃-C-X₂-C-X₅-C.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUILAR, O.M.; REILÄNDER, H.; ARNOLD, W.; PÜHLER, A. *Rhizobium meliloti* *nifN* (*fixF*) gene is part of an operon regulated by a *nifA*-dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to the *nifK* gene product. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 5393-5400, 1987.

ALBRIGHT, L.M.; HUALA, E.; AUSUBEL, F.M. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 23, p. 311-336, 1989.

ALLEN, R.M.; HOMER, M.J.; CHATTERJEE, R.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P.; SHAH, V.K. Dinitrogenase reductase- and MgATP-dependent maturation of apodinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, p. 23670-23674, 1993.

- ALLEN, R.M.; CHATTERJEE, R.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. Incorporation of iron and sulfur from NifB cofactor into the iron-molybdenum cofactor of dinitrogenase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, p. 26890-26896, 1995.
- ALVARES-MORALES, A.; DIXON, R.; MERRICK, M. Positive and negative control of the *glnAntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.**, Oxon, v. 3, p. 501-507, 1984.
- ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U.B.; PUHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Mol. Biol.**, Bethesda, v. 203, p. 715-738, 1988.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, p.4830-4838, 1996.
- ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. Characterization of *Escherichia coli glnL* mutations affecting nitrogen regulation. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 174, p. 4538-4548, 1992.
- AUSTIN, S.; HENDERSON, N.; DIXON, R. Characterisation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NIFA and NIFL in vitro. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 187, p. 353-360, 1990.

- AUSTIN, S.; DIXON, R. The procariotic enhancer binding protein NTRC has a ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. **EMBO (Eur, Mol. Bio. Organ) J.**, Oxon, v. 11, p. 2219-2228, 1992.
- BAKER, M.E. Similarities between legume-rhizobium communication and steroid-mediated intracellular communication in vertebrates. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 38, p. 541-547, 1992.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Intl. J. Sys. Bact.**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehavot, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHOFF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of a clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, Washington, v. 46, p. 802-810, 1996.

- BATUT, J.; DAVERAN-MINGOT, M.L.; DAVID, M.; JACOBS, J.; GARNERONE, A.M.; KAHN, D. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. **EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.**, Oxon, v. 8, p. 1279-1286, 1989.
- BENELLI, E.M.; BUCK, M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Purification and characterization of PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVI^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997: Caxambu). **Resumos...** Caxambu, 1997a. p. 47.
- 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, p. 4623-4626, 1997b.
- BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. The isolated catalytic of NifA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription in vitro: Activation is inhibited by NifL. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**, Washington, v. 91, p. 103-107, 1994.
- BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R.; DEAN, D.R.; JACOBSON, M.R.; CHISNELL, J.R.; RIZZO, T.M.; KOPCZYNSKI, J. Nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* strains having deletions in structural genes for nitrogenase. **Science**, (Washington, DC), v. 232, p. 92-94, 1986a.

- BISHOP, P.E.; HAWKINS, M.E.; EADY, R.R. Nitrogen fixation in molybdenum-deficient continuous culture by a strain of *Azotobacter vinelandii* carrying a deletion of the structural genes for nitrogenase (*nifHDK*). **Biochem. J.**, Washington, v. 238, p. 437-442, 1986b.
- BISHOP, P.E.; JOERGER, R.D. Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, Palo Alto, v. 41, p. 109-125, 1990.
- BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p 195-209, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRIGLE, K.E.; WEISS, M.C.; NEWTON, W.E.; DEAN, D.R. Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 1547-1553, 1987.

BROWN, M.S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E.R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII - regulatory protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, Washington, v. 68, p. 2949-2953, 1971.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; CANNON, M.C.; BEYNON, J.L.; CANNON, F.C. Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, v. 294, p. 776-778, 1981.

BUCK, M.; WOODCOCK, J.; CANNON, W.; WOODCOCK, J. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter may involve DNA loop formation. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 1, p. 1120-1126, 1987.

BUKEMA, W.J.; KLINGENSMITH, J.A.; GIBBONS, S.L.; AUSUBEL, F.M. Conservation of structure and location of *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae* *nifB* genes. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 1120-1126, 1987.

CANNON, W.; BUCK, M. Central domain of the positive control protein NifA and its role in transcriptional activation. **J. Mol. Biol.**, London, v. 225, p. 271-286, 1992.

CANNON, W.; CLAVERIE-MARTIN, F.; AUSTIN, S.; BUCK, M. Core RNA polymerase assists binding of the transcription factor σ^{54} to the promoter DNA. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 8, p. 287-298, 1993.

CANNON, W.; CLAVERIE MARTIN, F.; AUSTIN, S.; BUCK, M. Identification of a DNA-contacting surface in the transcription factor sigma-54. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 11, p. 227-236, 1994.

CANNON, W.; AUSTIN, S.; MOORE, M.; BUCK, M. Identification of close contacts between the σ^N (σ^{54}) protein and promoter DNA in closed promoter complexes. **Nucleic Acids. Res.**, Oxford, v. 23, p. 351-356, 1995a.

CANNON, W.; MISSAILIDIS, S.; SMITH, C.; COTTIER, A.; AUSTIN, S.; MOORE, M.; BUCK, M. Core RNA polymerase and promoter DNA interactions of purified domains of σ^N : bipartite functions., **J. Mol. Biol.**, London, v. 248, p. 781-803, 1995b.

CHISNELL, J.R.; PREMAKUMAR, R.; BISHOP, P.E. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 27-33, 1988.

DAVIS, R.; LEHMAN, L.; PETROVICH, R.; SHAH, V.R.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, p. 1445-1450, 1996.

DEAN, D.R.; BOLIN, J.T.; ZHENG, L. Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis., **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 6737-6744, 1993.

DEISTUNG, J.; CANNON, F.C.; CANNON, M.C.; HILL, S.; THORNELEY, R.N.F.

Electron transfer to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem. J.**, Washington, v. 231, p. 743-753, 1985.

DELGADO, A.; RAMOS, J. Genetic evidence for activation of the positive transcriptional

regulator XylR, a member of the NtrC family of regulators, by effector binding. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, p. 8059-8062, 1994.

DIANESE, J.C.; DOBEREINER, J.; SANTOS, T.P. Membrane protein patterns of three

Azospirillum species and *Herbaspirillum seropedicae*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 61, p. 223-230, 1989.

DILWORTH, M.J.; EADY, R.R.; ROBSON, R.L.; MILLER, R.W. Ethane formation from

acetylene as a potencial test for vanadium nitrogenase in vivo. **Nature**, London, v. 327, p. 167-170, 1987.

DILWORTH, M.J.; EADY, R.R.; ELDRIGE, M.E. The vanadium nitrogenase of

Azotobacter chroococcum: redution of acetylene and ethylene to ethane. **Biochem. J.**, Washington, v. 249, p. 745-751, 1988.

DIXON, R.; KENNEDY, C.; KONDOROSI, A.; KRISHNAPILLAI, V.; MERRICK, M.

Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 157, p. 189-198, 1977.

DIXON, R.; EADY, R.R.; ESPIN, G.; HILL, S.; IACCARINO, M.; KAHN, D.; MERRICK, M. Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. **Nature**, London, v. 286, p. 128-132, 1980.

DIXON, R. Tandem promoters determine regulation of the *Klebsiella pneumoniae* glutamine synthetase (*glnA*) gene. **Nucleic. Acids. Res.**, Oxford, v.12, p. 7811-7829, 1984.

DIXON, R.A.; HANDERSON, N.C.; AUSTIN, S. DNA supercoiling and aerobic regulation of transcription from the *Klebsiella pneumoniae nifLA* promoter. **Nucleic. Acids. Res.**, Oxford, v. 16, p. 9933-9946, 1988.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. The genus *Azospirillum*. In: **Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants**. Madison: Science Tech. Publishers, 1987, 155p.

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

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

DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R. *et al.* (eds.). **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 671-676.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: Fendrick, i., *et al.* (eds.). **Azospirillum VI and related microorganisms**. Springer-verlag Berlin Heidelberg, 1995. p. 3-14.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biol. Biochem.**, Exeter, v. 29, p. 771-774, 1997.

DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, v. 301, p. 302-307, 1983.

DRUMMOND, M.H.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. C. Sequence and domains relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to the other regulatory proteins. **EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.**, Oxon, v. 5, p. 441-447, 1986.

DRUMMOND, M.H.; WOOTTON, J.C. Sequence of *nifL* from *Klebsiella pneumoniae*: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 1, p. 37-44, 1987.

DRUMMOND, M.H.; CONTRERAS, A.; MITCHENALL, L.A. The function of isolated domains and chimaeric proteins constructed from the transcriptional activators NifA and NtrC of *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 4, p. 29-37, 1990.

DRUMMOND, M.; WALMSLEY, J.; KENNEDY, C. Expression from the *nifB* promoter of *Azotobacter vinelandii* can be activated by NifA, VnfA, or AnFA transcriptional activators. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, p. 788-792, 1996.

EADY, R.R.; ROBSON, R.L.; RICHARDSON, T.H.; MILLER, R.W.; HAWKINS, M. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*: purification and properties of VFe protein. **Biochem. J.**, Washington, v. 244, p. 197-207, 1987.

EADY, R.R. The Mo-, V-, and Fe-based nitrogenase systems of *Azotobacter*. **Adv. in Inorg. Chem.**, San Diego, v. 36, P. 77-102, 1991.

EMERICH, D.W.; BURRIS, R.H. Interactions of heterologous nitrogenase components that generate catalytically inactive complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, Washington, v. 73, p. 4369-4373, 1976.

FALK, E.C.; JOHNSON, J.L.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J.; KRIEG, N.R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, Washington, v. 36, p. 80-85, 1986.

- FENG, J.L.; GOSS, T.J.; BENDER, R.A.; NINFA, A.J. Activation of transcription initiation from the *nac* promoter of *Klebsiella aerogenes*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, p. 5523-5534, 1995.
- FIGURSKI, D.; HELSINKI, D.R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided by *trans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 78, p. 1648-1652, 1979.
- FILLER, W.A.; KEMP, R.M.; HAWKERS, T.R.; DIXON, R.A.; SMITH, B.E. The *nifH* gene product is required for the synthesis or stability of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 160, p. 371-377, 1986.
- FISCHER, H. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 58, p. 352-386, 1994.
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A Biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Boulder, v. 20, p. 68-74, 1994.
- FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 171, p. 3168-3175, 1989.

FUHRMANN, M.; FISCHER, H.; HENNECKE, H. Mapping of *Rhizobium japonicum* *nifB*⁻, *fixBC*⁻, and *fixA*-like genes and identification of the *fixA* promoter. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 199, p. 315-322, 1985.

GALLON, J.R. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, v. 6, p. 19-23, 1981.

GARCIA, E.; RHEE, S.G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 258, p. 2246-2253, 1983.

GEORGIADIS, M.M.; KOMIYAH, H.; CHAKRABARTI, P.; WOO, D.; KORNUC, J.J.; REES, D.C. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Science**, Washington, v. 257, p. 1653-1659, 1992.

GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF GROUP 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [*Aquaspirillum*] *authotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M. (eds). **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Acad. Publish., 1990. p. 293-294.

GOLDBERG, I.; NADLER, V.; HOCHMAN, A. Mechanism of nitrogenase switch-off by oxygen. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 874-879, 1987.

GOSINK, M.M.; FRANKLIN, N.M.; ROBERTS, G.P. The product of the *Klebsiella pneumoniae nifX* gene is a negative regulator of the nitrogen fixation (*nif*) regulon. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 172, p. 1441-1447, 1990.

GRÖNGER, P.; MANIAN, S.S.; REILÄNDER, H.; O'CONNEL, M.; PRIEFER, U.B.; PÜHLER, A. Organization and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL6JI containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. **Nucleic. Acids. Res.**, Oxford, v. 15, p. 31-49, 1987.

HALES, B.J.; LANGOSCH, D.J.; CASE, E.E. Isolation and characterization of a second nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii* [published erratum appears in J Biol Chem 1987 Mar 15;262(8):3927]. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 261, p. 15301-15306, 1986a.

HALES, B.J.; CASE, E.E.; MORNINGSTAR, J.E.; DZEDA, M.F.; MAUTERER, L.A. Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Biochemistry**, Washington, v. 25, p. 7251-7255, 1986b.

HALLENBECK, P.C. Mutations affecting nitrogenase switch-off in *Rhodobacter capsulatus*. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1118, p. 161-168, 1992.

HANKE, Sofia Joana Terlecki. Conjugação e transformação por eletroporação de *Herbaspirillum seropedicae* estirpes Z78, Z152 e ZA95. Curitiba, 1995. 124 p. Tese

(Mestrado Ciências-Bioquímica) setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do paran .

HARRIOT, O.T.; HOSTED, T.J.; BENSON, D.R. Sequences of *nifX*, *nifW*, *nifZ*, *nifB* and two ORF in the *Frankia* nitrogen fixation gene cluster. **Gene**, Amsterdam, v. 161, p. 63-67, 1995.

HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 165, p. 864-870, 1986.

HARTMANN, A.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 944-948, 1987.

HAWKES, T.R.; McLEAN, P.A.; SMITH, B.E. Nitrogenase from *nifV* mutants of *Klebsiella pneumoniae* contains an altered form of the iron-molybdenum cofactor. **Biochem. J.**, Washington, v. 217, p. 317-321, 1984a.

HAWKES, T.R.; SMITH, B.E. The inactive MoFe protein (NifB-Kp1) of the nitrogenase from *nifB* mutants of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem. J.**, Washington, v. 223, p. 783-792, 1984b.

HAWKES, T.; MERRICK, M.; DIXON, R. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 201, p. 492-498, 1985.

HE, L.; SOUPENE, E.; KUSTU, S. A new role for NtrC in nitrogen regulation of NifL activity. In: 11th INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION (1997: Paris). **Resumos...** Paris: Instituto Pasteur, 1997. p. 11.

HENDERSON, N.; AUSTIN, S.; DIXON, R.A. Role of metal ions in negative regulation of nitrogen fixation by the *nifL* gene product from *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 216, p. 484-491, 1989.

HENIKOFF, S. Unidirectional digestion with endonuclease III creates targets break points for DNA sequencing. **Gene**, Amsterdam, v. 8, p. 351-359, 1984.

HILL, S.; KAVANAGH, E.P. Roles of *nifF* and *nifJ* gene products in electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 141, p. 470-475, 1980.

HILL, S.; KENNEDY, C.; KAVANAGH, E.; GOLDBERG, R.B.; HANAU, R. Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *K. pneumoniae*. **Nature**, London, v. 290, p. 424-426, 1981.

HILL, S. How is nitrogenase regulated by oxygen. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 54, p. 111-130, 1988.

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

HOLLAND, D.; ZILBERSTEIN, A.; ZAMIR, A.; SUSSMAN, J.L. A quantitative approach to sequence comparisons of nitrogenase MoFe protein α - and β -subunits including the newly sequenced *nifK* gene from *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem. J.**, Washington, v. 247, p. 277-285, 1987.

HOLTEL, A.; MERRICK, M. Identification of the *Klebsiella pneumoniae glnB* gene: nucleotide sequence of wild-type and mutant alleles. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 215, p. 134-138, 1988.

HOMER, M.J.; PAUSTIAN, T.D.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P. The *nifY* product of *Klebsiella pneumoniae* is associated with apodinitrogenase and dissociates upon activation with the iron-molybdenum cofactor. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 4907-4910, 1993.

HOMER, M.J.; DEAN, D.R.; ROBERTS, G.P. Characterization of the γ protein and its involvement in the metallocluster assembly and maturation of dinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, p. 24745-24752, 1995.

HOOVER, T.R.; ROBERTSON, A.D.; CERNY, R.L.; HAYES, R.N.; IMPERIAL, J.; SHAH, V.K.; LUDDEN, P.W. Identification of the v factor needed for synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase as homocitrate. **NATURE**, London, v. 329, p. 855-857, 1987.

HOOVER, T.; IMPERIAL, J.; LUDDEN, P.; SHAH, V. Homocitrate is incorporated into the iron-molybdenum cofactor and affects substrate specificity of nitrogenase. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E. (eds). **Nitrogen Fixation: Hundred Years After** Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p. 127.

HOOVER, T.R.; IMPERIAL, J.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. Homocitrate is a component of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Biochemistry**, Washington, v. 28, p. 2768-2771, 1989.

HOWARD, K.S.; McLEAN, P.A.; HANSEN, F.B.; LEMLEY, P.V.; KOBLAN, K.S.; ORME-JOHNSON, W.H. *Klebsiella pneumoniae nifM* gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 261, p. 772-778, 1986.

HOWARD, J.B.; DAVIS, R.; MOLDENHAUER, B.; CASH, V.L.; DEAN, D. Fe:S cluster ligands are the only cysteines required for nitrogenase Fe-protein activities. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 264, p. 11270-11274, 1989.

HOWARD, J.B.; REES, D.C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 63, p. 235-264, 1994.

HUNT, T.P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 82, p. 8453-8457, 1985.

IMAISHI, H.; GOMADA, M.; INOUE, S.; NAKAZAWA, A. Physical map location of the *rpoN* gene of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 1550-1551, 1993.

IOANNIDIS, I.; BUCK, M. Nucleotide sequence of the *Klebsiella pneumoniae nifD* gene and predicted amino acid sequence of the α -subunit of nitrogenase MoFe protein. **Biochem. J.**, Washington, v. 247, p. 287-291, 1987.

JACOBSON, M.R.; PREMAKUMAR, R.; BISHOP, P.E. Transcriptional regulation of nitrogen fixation by molybdenum in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 167, p. 480-486, 1986.

JACOBSON, M.R.; BRIGLE, K.E.; BENNETT, L.T.; SETTERQUIST, R.A.; WILSON, M.S.; CASH, V.L.; BEYNON, J.; NEWTON, W.E.; DEAN, D.R. Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 171, p. 1017-1027, 1989a.

JACOBSON, M.R.; CASH, V.L.; WEISS, M.C.; LAIRD, N.F.; NEWTON, W.E.; DEAN, D.R. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 219, p. 49-57, 1989b.

JANSSEN, K.A.; MAGASANIK, B. Glutamine synthetase of *Klebsiella aerogenes*: genetic and physiological properties of mutants in the adenylation system. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 129, p. 993-1000, 1977

JOERGER, R.D.; BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *nifB-nifQ* region from *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 1475-1487, 1988.

JOERGER, R.D.; LOVELES, S.; PAU, R.N.; MITCHENALL, L.A.; SIMON, B.H.; BISHOP, P.E. Nucleotide sequences and mutational analysis of the structural genes for nitrogenase 2 of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 172, p.3400-3408, 1990.

JONES, D.H.A.; FRANKLIN, F.C.H.; THOMAS, C.M. Molecular analysis of the operon which encodes the RNA-polymerase sigma factor sigma (σ^{54}) of *Escherichia coli*. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 1035-1043, 1994.

KAHN, D.; DAVID, M.; DOMERGUE, O.; DAVERAN, M.; GHAI, J.; HIRSCH, P.R.; BATUT, J. *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen-fixation. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 171, p. 929-939, 1989.

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

KAMBEROV, E.S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, p. 17797-17807, 1995.

KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, v. 85, p. 4976-4980, 1988.

- KELLY, M.; POSTGATE, J.R.; RICHARDS, R.L. Reduction of cyanide and isocyanide by nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. **Biochem. J.**, Washington, v. 102, p. 1c-3c, 1967.
- KENNEDY, C.; GAMAL, R.; HUMPHREY, R.; RAMOS, J.; BRIGLE, K.; DEAN, D. The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterisation by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 205, p. 318-325, 1986.
- KIM, J.; REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, Washington, v. 33, p. 389-397, 1994.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, 1997a, in press.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F.P.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U. Structural organization the nitrogen fixation genes contiguous to *nifHDK* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVI^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997: Caxambu). **Resumos...** Caxambu, 1997b. p. 50.
- KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; PUHLER, A. Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 693-699, 1988.

KLOSE, K.E.; WEISS, D.S.; KUSTU, S. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. **J. Mol. Biol.**, Bethesda, v. 232, p. 67-78, 1993.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-Dependent Genes is Probably United by a Common Mechanism. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 53, p. 367-376, 1989.

LAANE, C.; KRONE, W.; KONINGS, W.; HAAKER, H.; VEEGER, C. Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* and by bacteroids of *Rhizobium leguminosarum*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 103, p. 39-46, 1980.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEHMN, L.J.; ROBERTS, G.P. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 5705-5711, 1991.

LEIGH, G.J. Biological nitrogen fixation and model chemistry. **Science**, (Washington, DC), v. 275, p. 1442, 1997.

LEO, A.; MAGASANIK, B. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 121, p. 313-319, 1975.

LEONG, S.A.; DITTA, G.S.; HELINSKI, D.R. Heme biosynthesis in *Rhizobium*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 257, p. 8724-8730, 1982.

LONETTO, M.; GRIBSKOV, M.; GROSS, C.A. The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 174, p. 3843-3849, 1992.

LOWE, D.J.; EADY, R.R.; THORNELEY, N.F. Electron-paramagnetic-resonance studies on nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Evidence for acetylene- and ethylene-nitrogenase transient complexes. **Biochem. J.**, Washington, v. 173, p. 277-290, 1978.

LOWE, D.J.; POSTGATE, J.R.; THORNELEY, R.N.F. Biochemical constrain on biological nitrogen fixation. In: MALIK, K.A.; NAQVI, S.H.M.; ALEEN, M.I.H. **Nitrogen and the Enviroment**. Faisalabad: Nuclear Inst. Agric. Biol, 1985. p. 73-91.

LOWERY, R.G.; SAARI, L.L.; LUDDEN, P.W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation *in vitro*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 166, p. 513-518, 1986.

LOWRY, O.M.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Mol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUDDEN, P.; SHAH, V.; ROBERTS, G.; RANGARAJ, P.; RUTTIMANN-JOHNSON, C.; FOULGER, T.; ALLEN, R.; HOMER, M.; ROLL, J. CHATTERJEE, R. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor and iron-vanadium cofactor of

nitrogenases. In: 11th INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION (1997: Paris). **Resumos...** Paris, 1997. p. 10.

MA, L.; GAVINI, N.; LIU, H.I.; HEDMAN, B.; HODGSON, K.D.; BURGESS, B.K.
Large scale isolation and characterization of the molybdenum-iron cluster from nitrogenase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, p. 18007-18015, 1994.

MacFARLANE, S.A.; MERRICK, M. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. **Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 13, p. 7591-7606, 1985.

MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 37, p. 549-553, 1991.

MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.
Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 1599-1602, 1995.

MAGASANIK, B. Regulation of transcription of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* by protein phosphorylation. **Biochimie**, Paris, v. 71, p. 1005-1012, 1989.

- MASEPOHL, B.; KLIPP, W.; PÜHLER, A. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 212, p. 27-37, 1988.
- MEIJER, W.G.; TABITA, F.R. Isolation and characterization of the *nifUSVW-rpoN* gene cluster from *Rhodobacter sphaeroides*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 174, p. 3855-3866, 1992.
- MEL, V.S.J.; KAMBEROV, E.S.; MARTIN, P.D.; ZHANG, J. NINFA, A.J.; EDWARDS, B.F.P. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *E. coli*. **J. Mol. Biol.**, Bethesda, v. 243, p. 796-798, 1994.
- MERRICK, M.; HILL, S. HENNECKE, H.; HAHN, M. DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 185, p. 75-81, 1982.
- MERRICK, M.J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. **EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.**, Oxon, v. 2, p. 39-44, 1983.
- MERRICK, M. J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Symbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman: Hall, New York, 1992. p. 835-876.

- MERRICK, M.; CHAMBERS, S. The helix-turn-helix motif of σ^{54} is involved in recognition of the -13 promoter region. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 174, p. 7221-7226, 1992.
- MERRICK, M.J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 59, p. 604-622, 1995.
- MILLER, J.H. **Experiments in molecular genetics**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, 1990,. p. 325-355.
- MILLER, A.F.; ORME-JOHNSON, W.H. The dependence on iron availability of allocation of iron to nitrogenase components in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, p. 9398-9408, 1992.
- MORENO-VIVIAN, C.; SCHMEHL, M.; MASEPOHL, B.; ARNOLD, W.; KLIPP, W. DNA sequence and genetic analysis of the *Rhodobacter capsulatus nifENX* gene region: homology between NifX and NifB suggests involvement of NifX in processing of the iron-molybdenum cofactor. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 216, p. 353-363, 1989.
- MORETT, E.; BUCK, M. *In vivo* studies on the interaction of RNA polymerase- σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters. The role of NifA in the formation of an open complex. **J. Mol. Biol.**, Bethesda, v. 210, p. 65-77, 1989.

- MORGAN, T.V.; McCRACKEN, J.; ORME-JOHNSON, W.H.; MIMS, W.B.; MORTENSON, L.E.; PEISACH, J. Pulsed electron paramagnetic resonance studies of the interaction of Mg-ATP and D₂O with the iron protein of nitrogenase. **Biochemistry**, Washington, v. 29, p. 3077-3082, 1990.
- NARBERHAUS, F.; LEE, H.S.; SCHMITZ, R.A.; HE, L.; KUSTU, S. The C-terminal domain of NifL is sufficient to inhibit NifA activity. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, p. 5078-5087, 1995.
- NINFA, A. J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**, Washington, v. 83, p. 5909-5913, 1986.
- NIXON, B.T.; RONSON, C.W.; AUSUBEL, F.M. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**, Washington, v. 83, p. 7850-7854, 1986.
- OLIVARES, F.L; BALDANI, V.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endopjytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* spp. in roots, stems and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biol. Fertil. Soils**, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Colonisation of micropropagated sugar cane by nitrogen-fixing bacteria co-inoculated with arbuscular-mycorrhizal *Glomus clarum*. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – The Role of Biological Nitrogen Fixation (1995: Angra dos Reis). **Resumos...** Angra dos Reis: EMBRAPA, 1995. p. 218-219.

OLIVER, S.G. *et al.* The complete DNA sequence of yeast chromosome III. **Nature**, London, v. 357, p. 38-46, 1992.

OW, D.W.; AUSUBEL, F.M. Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, v. 301, p. 307-313, 1983.

PAGANI, S.; ELDRIDGE, M.; EADY, R.R. Nitrogenase of *Klebsiella-pneumoniae*-rhodanese-catalyzed restoration of activity of the inactive 2Fe species of the Fe protein. **Biochem. J.**, Washington, v. 244, p. 485-488, 1987.

PAGANI, S.; FRANCHI, E.; COLNAGHI, R.; KENNEDY, C. Identification of sulfotransferase enzymes in *Azotobacter vinelandii*. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 278, p. 151-154, 1991.

PAGE, W.J.; COLLINSON, S.K. Molybdenum enhancement of nitrogen fixation in a Mo-starved *Azotobacter vinelandii nif*- mutant. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 28, p. 1173-1180, 1982.

PAHEL, G.; ROTHSTEIN, D.M.; MAGASANIK, B. Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 150, p. 202-213, 1982.

PARK, B.C.; KIM, J.S.; LEE, D.; BYUN, S.M. One-strain PCR: a comparably efficient method for chromosomal walking. **BioTechniques**, Natick, v. 21, p.592-593,1996.

PATRIQUIM, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 29, p. 900-915, 1983.

PAU, R.N.; MITCHENALL, L.A.; ROBSON, R.L. Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 171, p. 124-129, 1989.

PAUL, W.; MERRICK, M. Analysis of the *nifW,Z,M* genes of *Klebsiella pneumoniae*. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F.; NEWTON, W.E. (eds) **Nitrogen Fixation: hundred years after**. Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation. Stuttgart: Gustav Fisher, 1988. p. 315

PAUL, W.; MERRICK, M. The roles of the *nifW*, *nifZ* and *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 178, p. 675-682, 1989.

PAUSTIAN, T.D.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P. Purification and characterization of *nifN* and *nifE* gene products from *Azotobacter vinelandii* mutant UW45. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**, Washington, v. 86, p. 6082-6086, 1989.

PAUSTIAN, T.D.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.; Apodinitrogenase: purification association with a 20-kilodalton protein, and activation by the iron-molybdenum cofactor in the absence of dinitrogenase reductase. **Biochemistry**, Washington, v. 29, p. 3515-3522, 1990.

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. *nif* mutants of *Azospirillum brasilense*: evidence for a *nif* a-type regulation. In: KLINGMULLER, W. (eds). **Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology**. Basel: Birkhauser-Verlag, 1983. p. 66-77.

PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Lett.**, Amesterdam, v. 23, p. 95-101, 1984

PEDROSA, F.O. Fixação Biológica de Nitrogênio: Fértil Idéia. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 6, p. 12-13, 1987.

PEDROSA, F.O. Physiology ,biochemistry and genetics of *Azospirillum* and others root-associated nitrogen-fixing bacteria. **Critical Rev. Plant Sci.**, Boca Raton, v. 6, p. 345-384, 1988.

- PEDROSA, F.O.; TEIXEIRA, K.R.S.; MACHADO, I.M.P.; STEFFENS, M.B.R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E.M.; MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; ISHIDA, M.L.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, Exeter, v. 29, p. 843-846, 1997.
- PETERS, J.W.; FISHER, K.; DEAN, D.R. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 49, p. 335-366, 1995.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans*. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 61-65, 1991.
- POPE, M.R.; MURRELL, S.A.; LUDDEN, P.W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphorylation of a specific arginyl residue. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**, Washington, v. 82, p. 3173-3177, 1985.
- POPE, M.R.; SAARI, L.L.; LUDDEN, P.W. N-glycohydrolysis of adenosine diphosphoribosyl arginine linkages by dinitrogenase reductase activating glycohydrolase (activating enzyme) from *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 261, p. 10104-10111, 1986.

POPHAM, D.L.; SZETO, D; KEENER, J.; KUSTU, S. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhances. **Science**, (Washington, DC), v. 243, p. 629-635, 1989.

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

POSTGATE, J.R. Biological nitrogen fixation: Fundamentals. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, Brighton, v. 296, p.375-385, 1982b.

PREISIG, O.; ANTHAMATTEN, D.; HENNECKE, H. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**, Washington, v. 90, p. 3309-3313, 1993.

PREMAKUMAR, R.; CHISNELL, J.R.; BISHOP, P.E. A comparison of the three dinitrogenase reductases expressed by *Azotobacter vinelandii*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v 5, p. 344-348, 1989.

REITZER, L.J.; MAGASANIK, B. Isolation of the nitrogen assimilation regulator NR_I, the product of the *glnG* gene of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**, Washington, v. 80, p. 5554-5558, 1983.

REITZER, L.J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA.**, Washington, v. 82, p. 1979-1983, 1985.

RICKWOOD, D.; HAMES, B.D. **Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach**. IRL Press. 2^a edição. 1990.

RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.M.; FUNAYAMA, S.; PEDROSA, F.O. Mutagenesis and nucleotide sequence of the glutamine synthetase structural gene of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXV^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1996: Caxambu). **Resumos...** Caxambu, 1997 p. 49.

ROA, B.B.; CONNOLLY, D.M.; WINKLER, M.E. Overlap between *pdxA* and *ksgA* in the complex *pdxA-kgsA-apaG-apaH* operon of *Escherichia coli* K12. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 171, p. 4767-4777, 1989.

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

ROBINSON, A.C.; DEAN, D.R.; BURGESS, B.K. Iron-molybdenum cofactor biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* requires the iron protein of nitrogenase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 262, p. 14327-14332, 1987.

ROBSON, R.L. Characterization of an oxygen stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum*. **Biochem. J.**, Washington, v. 181, p. 569-575, 1979.

ROBSON, R.L.; POSTGATE, J.R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 34, p. 183-207, 1980.

ROBSON, R.L.; EADY, R.R.; RICHARDSON, T.H.; MILLER, R.W.; HAWKINS, M.; POSTGATE, J.R. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. **Nature**, London, v. 322-390, p. 388, 1986.

ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. **EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.**, Oxon, v. 8, p. 1217-1224, 1989.

RODRIGUEZ-QUIÑONES, F.; BOSCH, R.; IMPERIAL, J. Expression of the *nifBfdxNnifOQ* region of *Azotobacter vinelandii* and its role in nitrogenase activity. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 2926-2935, 1993.

ROLL, J.; SHAH, V.K.; DEAN, D.R.; ROBERTS, G.P. Characteristics of NifNE in *Azotobacter vinelandii* strains. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, p. 4432-4437, 1995.

ROSSEN, L.; MA, Q.; MUDD, E.A.; JOHNSTON, A.W.B.; DOWNIE, J.A. Identification and DNA sequence of *fixZ*, a *nifB*-like gene from *Rhizobium leguminosarum*. **Nucl. Acids_Res.**, Oxford, v. 12, p. 7123-7134, 1984.

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

SANDERS, D.A.; GILLECE-CASTRO, B.L.; BURLINGAME, A.L.; KOSHLAND JR, D.E. Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 174, p. 5117-5122, 1992.

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

SANTERO, E.; HOOVER, T.R.; NORTH, A.K.; BERGER, D.K.; PORTER, S.C.; KUSTU, S. Role of integration host factor in stimulating transcription from the σ^{54} -dependent *nifH* promoter. **J. Mol. Biol.**, Bethesda, v., p.602-620, 1992.

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

SCHNEIDER, K.; MÜLLER, A.; SCHRAMM, U.; KLIPP, W. Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 195, p. 653-661, 1991.

SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R.H. Reduction of azide by the N₂-fixing enzyme system. **Biochemistry**, Washington, v. 57, p. 1317-1967, 1967.

SCOTT, D.J.; MAY, H.D.; NEWTON, W.E.; BRIGLE, K.E.; DEAN, D.R. Role for nitrogenase MoFe protein β -subunit in FeMo-cofactor binding and catalysis. **Nature**, London, v. 343, p. 188-190, 1990.

SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, Washington, v. 74, p. 3249-3253, 1977.

SHAH, V.K.; STACEY, G.; BRILL, W.J. Electron transport to nitrogenase. Purification and characterization of pyruvate: flavodoxin oxidoreductase the *nifJ* gene product. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 259, p. 12064-12068, 1983.

SHAH, V.K.; IMPERIAL, J.; UGALDE, R.A.; LUDDEN, P.W.; BRILL, W.J. In vitro synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, Washington, v. 83, p. 1636-1640, 1986.

SHAH, V.K.; HOOVER, T.R.; IMPERIAL, J.; PAUSTIAN, T.D.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Role of *nif* gene products and homocitrate in the biosynthesis of iron-

molibdenum cofactor. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E. (eds). **Nitrogen Fixation: Hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1988. p. 115-120.

SHAH, V.K.; ALLEN, J.R.; SPANGLER, N.J.; LUDDEN, P.W. In vitro synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Purification and characterization of NifB cofactor, the product of NifB protein. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, p. 1154-1158, 1994.

SHIAU, S.P.; CHEN, P.; REITZER, L.J. Effects of insertions and deletions in *glnG* (*ntrC*) of *Escherichia coli* on Nitrogen Regulator I-dependent DNA binding and transcriptional activation. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 190-199, 1993.

SIBOLD, L.; ELMERICH, C. Constitutive expression of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae* due to a DNA duplication. **EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.**, Oxon, v. 1, p. 1551-1558, 1982.

SIDDAVATTAM, D.; NICKLES, A.; HERTERICH, S.; STEIBL, H.; KREUTZER, R.; KLINGMÜLLER, W. Site-specific mutagenesis in *Enterobacter agglomerans*: construction of *nifB* mutants and analysis of the gene's structure and function. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 249, p. 526-532, 1995.

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

SMITH, B.E.; ROE, S.M.; YOUSAFZAI, F.K. The structures of the nitrogenase proteins - an overview. In: **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. TIKHONOVICH, I.A. *et al.*, (eds). p. 19-27, 1995.

SOUZA, Emanuel Maltempi, Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1990. 264 p. Tese (Doutorado 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, p. 425-429, 1991a.

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

SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Deletions analysis of the promoter region of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae*. In: **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. TIKHONOVICH, I.A.; NIKOLAI, A.P.; VASSILY,

I.R.; WILLIAM, E.N. (eds). X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, 1995a. p. 260.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; MACHADO, H.B.; DRUMMOND, M.; YATES, M.G.

The N-terminus of the NifA protein of *H. seropedicae* is probably involved in sensing of ammonia. In: **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. TIKHONOVICH, I.A.; NIKOLAI, A.P.; VASSILY, I.R.; WILLIAM, E.N. (eds). X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, 1995b. p. 260.

STOCK, J.B.; NINFA, A.J.; STOCK, A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 53, p. 450-490, 1989.

SUNDARESAN, V.; AUSUBEL, F.M. Nucleotide sequence of the gene coding for the nitrogenase iron protein from *Klebsiella pneumoniae*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 256, p.2808-2812, 1981.

TAL, S.; CHUN, T.W.; GAVINI, N.; BURGESS, B.K. The Δ -NIFB (or Δ -NIFE) FeMo cofactor-deficient MoFe protein is different from the Δ -NIFH protein. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 266, p. 10654-10657, 1991.

TARTOF, K.D.; HOBBS, C.A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. **Bethesda Res. Lab Focus**, v. 9, p. 12, 1987.

TEIXEIRA, Kátia Regina. Isolamento e caracterização do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae* Z78. Curitiba, 1991. 108 p. Tese (mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

THÖNY, B.; HENNECKE, H. The -24/-12 promoter comes of age. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 63, p. 341-358, 1989.

TINTUT, Y.; WONG, C.; JIANG, Y.; HSIEH, M.; GRALLA, J.D. RNA polymerase binding using a strongly acidic hydrophobic-repeat region of σ^{54} . **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, Washington, v. 91, p. 2120-2124, 1994.

TRAVERS, A.A.; BURGESS, R.R. Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. **Nature**, London, v. 222, p. 537-540, 1969.

UENO-NISHIO, S.; BACKMAN, K.C.; MAGASANIK, B. Regulation at the *glnL*-operator-promoter of the complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 153, p. 1247-1251, 1983.

UGALDE, R.A.; IMPERIAL, J.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor and the molybdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae*: Effect of the sulfur source. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 164, p. 1081-1087, 1985.

van BERKUN, P.; BOHLOOL, B.B. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 44, p. 491-517, 1980.

van HEESWIJK, W.C.; RABENBERG, M.; WESTERHOFF, H.V.; KAHN, D. The genes of the glutamine synthetase adenylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 9, p. 443-457, 1993.

van SLOOTEN, J.C.; CERVANTES, E.; BROUGHTON, W.J.; WONG, C.H.; STANLEY, J. Sequence and analysis of the *rpoN* sigma factor gene of *Rhizobium* sp. strain NGR234, a primary coregulator of symbiosis. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 172, p. 5563-5574, 1990.

VASUDEVAN, S.G.; GEDYE, C.; DIXON, N.E.; CHEAH, E.; CARR, P.D.; SUFFOLK, P.M.; JEFFREY, P.D.; OLLIS, D.L. *Escherichia coli* PII protein: purification, crystallization and oligomeric structure. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 337, p.255-258, 1994.

WANG, S.; DEAN, D.R.; CHEN, J.; JOHNSON, J.L. The N-terminal and C-terminal portions of NifV are encoded by two different genes in *Clostridium pasteurianum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 3041-3046, 1991.

WASSEM, R.; PEDROSA, F.P.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Structural and functional analysis of the *nifA* promoter of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVI^a

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997: Caxambu). **Resumos...** Caxambu, 1997. p. 50.

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

WEISS, D.S.; BATUT, J.; KLOSE, K.E.; KEENER, J.; KUSTU, S. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. **Cell**, Cambridge, v. 67, p. 155-167, 1991.

WEISS, V.; CLAVERIE-MARTIN, F.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen-regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for the activation of transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, Washington, v. 89, p. 5088-5092, 1992.

WHITE, T.C.; HARRIS, G.S.; ORME JOHNSON, W.H. Electrophoretic studies on the assembly of the nitrogenase molybdenum-iron protein from the *Klebsiella pneumoniae* *nifD* and *nifK* gene products. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, p. 24007-24016, 1992.

WHITEHALL, S.; AUSTIN, S.; DIXON, R. DNA supercoiling response of the σ^{54} -dependent *Klebsiella pneumoniae* *nifL* promoter *in vitro*. **J. Mol. Biol.**, Bethesda, v. 225, p. 591-607, 1992.

WONG, C.; GRALLA, J.D. A role for the acidic trimer repeat region of transcription factor σ^{54} in setting the rate and temperature dependence of promoter melting *in vivo*. **J. Mol. Biol.**, Bethesda, v. 267, p. 24762-24768, 1992.

WYMAN, C.; ROMBEL, I.; NORTH, A.K.; BUSTAMANE, C.; KUSTU, S. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. **Science**, (Washington DC), v. 275, p. 1658-1661, 1997.

YATES, M.G. The role of oxygen and hydrogen in nitrogen fixation. In: COLE, J.A.; FERGUSON, S. (eds). **The Nitrogen and Sulphur Cycles**. Society for General Microbiology Symposium. 1987. p. 383-415.

ZHENG, G.L.; WHITE, R.H.; CASH, V.L.; JACK, R.F.; DEAN, D.R. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 90, p. 2754-2758, 1993.

ZHENG, L.; DEAN, D.R. Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulphur cluster. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, p. 18723-18726, 1994.