

EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA

Clonagem, Caracterização e Seqüenciamento dos
Genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*

Tese apresentada ao Departamento de Bio-
química da Universidade Federal do Paraná
para a obtenção do título de Doutor em
Bioquímica.

CURITIBA
1990

ORIENTADORES:

Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Dr. Shigehiro Funayama

Aos meus pais, Florisvaldo e
Tereza,
à minha esposa Jaisa
e ao meu filho Henrique.

AGRADECIMENTOS

Sou grato aos Drs. Fábio de Oliveira Pedrosa e Shigehiro Funayama, orientadores desta tese, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela confiança depositada e pela amizade com que me distinguiram no decorrer desses anos:

à Dra. Liu Un Rigo, pelo acompanhamento das atividades desenvolvidas, pelas contribuições feitas na forma de discussões e sugestões, visando o aprimoramento da minha formação e pelo apoio amigo nas horas difíceis;

ao Dr. Marshal Geoffrey Yates, pela oportunidade de trabalhar no Nitrogen Fixation Laboratory - AFRC, na University of Sussex, como seu orientado, pelo apoio nas horas de insegurança, pela confiança e pela amizade dispensados;

a todos os Coordenadores que estiveram à frente do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica no decorrer desses anos, na pessoa do Dr. Fábio O. Pedrosa, pelo esforço desenvolvido no sentido de proporcionar condições adequadas ao desenvolvimento das atividades acadêmicas e de tese;

à Dra. Glaci Therezinha Zancan, pela primeira visão da bioquímica enquanto ciência e pelo estímulo contínuo;

a todos os professores do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela forma com que fui acolhido e pela colaboração no empréstimo de reativos, instalações ou equipamentos;

à Dra. Christina Kennedy, ao Dr. Richard Pau e a Paul Woodley pelas discussões e sugestões;

aos amigos que cultivei no Departamento de Bioquímica, em especial ao Hidevaldo, Maria Berenice, Enilda e Edilene, pela amizade mantida nesses anos;

à Frances, pelo companheirismo, pela ajuda e pela convivência agradável durante a minha estada no Nitrogen Fixation Laboratory;

à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro;

à minha esposa, Jaísa, pela compreensão pela minha ausência e nos momentos difíceis, pelas sugestões e pelo amor com que criou condições para o desenvolvimento deste trabalho;

aos meus pais e irmãos, que me acompanharam nesse período e tanto fizeram para que eu chegasse a este estágio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE ADENDOS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
RESUMO.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O COMPLEXO DA NITROGENASE.....	2
1.2. CONTROLE DA ATIVIDADE DA NITROGENASE POR	
AMÔNIO E OXIGÊNIO.....	7
1.2.1. Inibição da nitrogenase por amônia.....	7
1.2.2. Inibição da nitrogenase por oxigênio.....	9
1.3. MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA NITROGENASE	
CONTRA OXIGÊNIO.....	10
1.4. NITROGENASES ALTERNATIVAS.....	13
1.5. GENÉTICA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	15
1.5.1. Genes <u>nif</u> em <i>K. pneumoniae</i>.....	15
1.5.2. Genes <u>nif</u> em <i>Rhizobium</i> e <i>Bradyrhizobium</i>....	23
1.5.3. Genes <u>nif</u> em <i>Azotobacter</i>.....	25
1.5.3.1. Genética da nitrogenase convencional.....	25
1.5.3.2. Genética das nitrogenases alternativas....	26
1.5.4. Genes <u>nif</u> em <i>Azospirillum</i>.....	28
1.6. REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	30
1.6.1. Regulação da fixação de nitrogênio em	
<i>K. pneumoniae</i>.....	30

1.6.1.1.	Os promotores <u>nif</u>	33
1.6.1.2.	NifA: uma proteína capaz de interagir com DNA.....	37
1.6.1.3.	O papel do sistema <u>ntr</u>	40
1.6.1.4.	Mecanismo de ativação dos promotores -24/-12.....	43
1.6.1.5.	Repressão da fixação de nitrogênio: o papel da proteína NifL.....	47
1.6.2.	Regulação da fixação de nitrogênio em <u>Rhizobium</u> e <u>Bradyrhizobium</u>	50
1.6.3.	Regulação da fixação de nitrogênio em <u>Azotobacter</u>	52
1.6.4.	Regulação da fixação de nitrogênio em <u>Azospirillum</u>	54
1.7.	<u>H. seropedicae</u> : UM NOVO MODELO PARA O ESTUDO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	55
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
2.1.	BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E BACTERIÓFAGOS.....	57
2.2.	REAGENTES.....	57
2.3.	MEIOS DE CULTURA E ANTIBIÓTICOS.....	61
2.4.	TRATAMENTO DAS MEMBRANAS DE DIALISE.....	64
2.5.	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FENOL E FENOL-CLOROFÓRMIO.....	64
2.6.	DEIONIZAÇÃO DA FORMAMIDA.....	65
2.7.	DOSAGEM DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO MOLECULAR.	65
2.8.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE...	65
2.8.1.	Determinação da atividade de nitrogenase em meio líquido.....	66

2.8.2.	Determinação da atividade de nitrogenase em meio semi-sólido.....	66
2.8.3	Determinação da concentração de proteínas..	67
2.9.	ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	67
2.10.	QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	68
2.10.1	Quantificação de DNA por espectrofotometria	68
2.10.2	Quantificação de DNA pela complexação com brometo de etídio.....	68
2.11.	PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	69
2.11.1.	Purificação de plasmídeos em larga escala..	69
2.11.2.	Minipreparação de plasmídeos.....	70
2.11.2.1.	Minipreparação de plasmídeos de <i>E. coli</i> ...	70
2.11.2.2.	Minipreparação de plasmídeos de <i>A. brasiliense</i>	71
2.12.	PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL DE <i>H. seropedicae</i> .	72
2.13.	CONDIÇÕES DE DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	73
2.13.1.	Soluções tampão e condições gerais.....	73
2.13.2.	Determinação das condições de hidrólise parcial do DNA de <i>H. seropedicae</i>	75
2.13.3.	Digestão do DNA de <i>H. seropedicae</i> em larga escala.....	75
2.13.4.	Digestão do plasmídeo pVK102 em larga escala.....	75
2.14.	FRACIONAMENTO DOS FRAGMENTOS DO DNA DE <i>H. seropedicae</i> PARCIALMENTE HIDROLIZADO POR <u>Sal I</u>	76
2.15.	LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA.....	77

2.16.	EMPACOTAMENTO DO DNA EM PARTÍCULAS DE FAGO LAMBDA "IN VITRO".....	78
2.16.1.	Preparo do extrato de empacotamento sonicado.....	78
2.16.2.	Preparo do extrato de empacotamento por congelamento/descongelamento.....	79
2.16.3.	Reação de empacotamento "in vitro".....	80
2.17.	INFECÇÃO DE <u>E. coli</u> COM FAGO LAMBDA.....	81
2.18.	PURIFICAÇÃO DO DNA DO FAGO LAMBDA.....	81
2.18.1.	Purificação do DNA do fago λ L47.1.....	81
2.18.2.	Purificação do DNA do fago λ <u>cits</u> 857 <u>Sam</u> 7....	82
2.19.	CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE <u>H. seropedicae</u>	84
2.19.1.	Cálculo da representatividade do banco de genes.....	85
2.20.	CONJUGAÇÃO.....	85
2.20.1.	Transferência de plasmídeos auto-transmissíveis por conjugação.....	85
2.20.2.	Transferência de plasmídeos mobilizáveis por conjugação.....	86
2.21.	TRANSFORMAÇÃO.....	87
2.21.1	Preparo de células de <u>E. coli</u> competentes..	87
2.21.2.	Transformação de células competentes com DNA.....	88
2.21.3.	Transformação rápida.....	89
2.22.	CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS.....	89

2.23.	PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE	90
2.23.1.	Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose com papel de DEAE-celulose.....	90
2.23.2.	Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão.....	91
2.24.	MARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA.....	92
2.24.1.	"Nick-translation".....	92
2.24.2.	Marcação de fragmentos de DNA por síntese utilizando hexadesoxinucleotídeos como "primer".....	93
2.24.3.	Marcação com dUTP-digoxigenina.....	93
2.25.	DETERMINAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS MARCADOS COM ^{32}P AO DNA.....	94
2.26.	PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA MARCADOS COM ^{32}P	94
2.26.1.	Preparo do gel de Sephadex G-50.....	95
2.26.2.	Cromatografia de DNA marcado em Sephadex G-50.....	95
2.27.	TRANSFERÊNCIA DO DNA DO GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE OU DE NYLON.	95
2.28.	HIBRIDIZAÇÃO.....	97
2.28.1.	Hibridização utilizando leite desnatado Molico como agente bloqueador.....	98
2.28.2.	Hibridizações utilizando a solução de Denhardt como agente bloqueador.....	99

2.28.3.	Hibridização utilizando prova marcado com dUTP-digoxigenina.....	100
2.29.	MAPEAMENTO DO TRANSCRITO CONTENDO O GENE <u>nifA</u> DE <u>H. seropedicae</u>	100
2.29.1.	Purificação de RNA total de <u>A. brasiliense</u> ..	100
2.29.2.	Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído.....	101
2.29.3.	Transferência do RNA para a membrana de nylon.....	102
2.29.4.	Hibridização DNA/RNA.....	103
2.30.	SUBCLONAGEM.....	103
2.31.	CONSTRUÇÃO DE FUSÕES <u>lacZ</u> AO GENE <u>nifA</u> DE <u>H. seropedicae</u>	104
2.32.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE.....	105
2.33.	OBTENÇÃO DE DELEÇÕES PARA SEQUENCIAMENTO...	107
2.34.	PURIFICAÇÃO DE DNA DE FITA SIMPLES.....	109
2.35.	SEQUENCIAMENTO.....	110
2.35.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	110
2.35.2.	Hibridização do "primer" ao DNA molde de fita simples.....	112
2.35.3.	Reações de sequenciamento.....	112
2.35.3.1.	Preparo das misturas de desoxi/didesoxinucleotídeos.....	113
2.35.3.2.	Reações de sequenciamento e eletroforese...	113
2.35.4.	Leitura das autoradiografias.....	115
2.35.5.	Edição e análise das sequências.....	115
3.	RESULTADOS.....	117

3.1.	CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	117
3.2.	COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE <i>nifA</i> ⁻ (FP10) DE <i>A. brasiliense</i>	118
3.3.	ISOLAMENTO DO PLASMÍDEO pEMS1.....	119
3.4.	MAPA DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS pEMS1 E pEMS101.....	119
3.5.	COMPLEMENTAÇÃO DE OUTROS MUTANTES <i>nif</i> DE <i>A. brasiliense</i> PELO PLASMÍDEO pEMS1.....	120
3.6.	MAPEAMENTO DA REGIÃO <i>nifA</i> NO PLASMÍDEO pEMS1 POR SUBCLONAGEM.....	120
3.7.	MAPEAMENTO DA REGIÃO <i>nifA</i> NO PLASMÍDEO pEMS101 POR HIBRIDIZAÇÃO.....	121
3.8.	DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>nifA</i> NO GENOMA DE <i>H. seropedicae</i>	122
3.9.	DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES <i>nifHDK</i> NO PLASMÍDEO pEMS1 E NO GENOMA DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	123
3.10.	OBTENÇÃO DE DELEÇÕES PARA SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CONTENDO O GENE <i>nifA</i> DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	124
3.11.	SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CONTENDO O GENE <i>nifA</i> DE <i>H. seropedicae</i>	125
3.12.	SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS DO GENE <i>nifA</i>	129
3.13.	A SEQUÊNCIA DO GENE <i>nifB</i> DE <i>H. seropedicae</i> . 131	
3.14.	IDENTIFICAÇÃO DE UMA ORF POTENCIAL PRECEDENDO O GENE <i>nifA</i>	132
3.15.	CONSTRUÇÃO DE FUSÕES <i>nifA</i> :: <u>lacZ</u>	133

3.16.	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <u>nifA</u> DE <u>H.</u> <u>seropedicae</u>	135
3.17.	MAPEAMENTO DE TRANSCRITOS CONTENDO O GENE <u>nifA</u> DE <u>H. seropedicae</u>	136
3.18.	CONTEÚDO (G + C) DA REGIÃO SEQUENCIADA DO GENOMA DE <u>H. seropedicae</u>	137
3.19.	USO DE CODONS NOS GENES <u>nifA</u> E <u>nifB</u> DE <u>H.</u> <u>seropedicae</u>	137
4.	DISCUSSÃO.....	184
5.	CONCLUSÕES.....	209
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	211

LISTA DE FIGURAS

1	Organização dos genes <u>nif</u> em <u>K. pneumoniae</u> , <u>A. vinelandii</u> , <u>A. chroococcum</u> , <u>B. melliloti</u> e <u>B. japonicum</u>	17
2	Modelo proposto para o controle do regulon <u>nif</u> em <u>K. pneumoniae</u>	32
3	Modelo para a regulação da atividade da proteína NtrC em resposta ao "status" de nitrogênio.....	42
4	Modelo de ativação da transcrição de promotor -24/-12 por NifA.....	45
5	Esquema de construção do banco de genes de <u>H. seropedicae</u>	139
6	Perfil eletroforético de clones do banco de genes de <u>H. seropedicae</u>	140
7	Perfil eletroforético de clones do banco de genes de <u>H. seropedicae</u> digeridos com <u>Sal</u> I.....	141
8	Perfil eletroforético dos transconjugantes de <u>A. brasiliense</u> FP10 Nif ⁺	142
9	Perfil eletroforético dos transconjugantes FP10.9 e FP10.9(R68.45).....	143
10	Mapa de restrição dos plasmídeos pEMS1 e pEMS101...	144
11	Plasmídeos derivados do plasmídeo pEMS1.....	145
12	Esquema dos fragmentos de DNA contendo o gene <u>nifA</u> de <u>K. pneumoniae</u> utilizados nos experimentos de hibridização.....	146

13 Hibridização do plasmídeo pEMS1 e pEMS101 com o fragmento <u>Sal</u> I do plasmídeo pMC71A.....	147
14 Hibridização do plasmídeo pEMS1 e pEMS101 com o fragmento <u>Sal</u> I/ <u>Sma</u> I do plasmídeo pMC71A.....	148
15 Hibridização do plasmídeo pEMS1 e pEMS101 com o fragmento <u>Nru</u> I do plasmídeo pMC71A.....	149
16 Hibridização do DNA cromosomal de <u>H. seropedicae</u> com o gene <u>nifA</u> de <u>K. pneumoniae</u>	150
17 Hibridização do DNA cromosomal de <u>H. seropedicae</u> com os genes <u>nifHDK</u> de <u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u>	151
18 Perfil eletroforético dos plasmídeos derivados de pEMS300.....	152
19 Perfil eletroforético de DNA de fita simples do plasmídeo pEMS301 e seus derivados.....	153
20 Sobreposição dos fragmentos sequenciados em ambos os sentidos.....	154
21 Sequência de nucleotídeos da região do gene <u>nifA</u> de <u>H. seropedicae</u>	155
22 Identificação de possíveis regiões codificadoras de proteínas pelo método de preferência posicional de bases.....	159
23 Identificação de possíveis regiões codificadoras de proteínas pelo método de Shepherd.....	160
24 Identificação de possíveis regiões codificadoras de proteínas pelo método de uso preferencial de codons.....	161

25	Alinhamento da sequência de aminoácios da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> e outras proteínas homólogas	162
26	Comparação do domínio D da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com o de outras proteínas homólogas....	164
27	Comparação do domínio E da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com o de outras proteínas homólogas....	165
28	Comparação do interdomínio D-E da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com o de outras proteínas homólogas.	166
29	Comparação dos promotores dos genes <i>nifA</i> e <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> com outros promotores ativados por NtrC e NifA.....	167
30	Comparação da sequência anaerobox e do sítio de ligação para IHF encontrados no gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> com sequências homólogas encontradas em outros genes.....	168
31	Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína NifB de <i>H. seropedicae</i> com outras proteínas homólogas.....	169
32	Mapa de restrição do transposor <i>Tn5</i> -B21.....	170
33	Determinação do ponto de inserção do transponson <i>Tn5</i> -B21 nos plasmídeos pEMS109 e pEMS110.....	171
34	Esquema de construção dos plasmídeos derivados de pEMS109.....	172
35	Hibridização do RNA total de <i>A. brasiliense</i> FP10(pEMS107) com sonda contendo o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i>	173
36	Modelo proposto para a regulação da fixação de nitrogênio em <i>H. seropedicae</i>	206

LISTA DE TABELAS

1	Estírpes de bactérias, plasmídeos e bacteriófagos utilizados.....	58
2	Misturas de dNTP/ddNTP utilizadas nas reações de sequenciamento.....	113
3	Frequência de conjugação do banco de genes de <i>H. seropedicae</i> com <i>A. brasiliense</i> estírpe FP10.....	174
4	Complementação do mutante FP10 de <i>A. brasiliense</i> pelo plasmídeo recombinante pEMS1.....	175
5	Complementação de outros mutantes Nif ⁻ de <i>A. brasiliense</i> pelo plasmídeo recombinante pEMS1.....	176
6	Plasmídeos derivados de pEMS1 e suas capacidades de complementarem o mutante FP10.....	177
7	Homologia entre a proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> e as de <i>K. pneumoniae</i> , <i>R. meliloti</i> , <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> e <i>A. caulinodans</i> nos domínios D e E....	178
8	Plasmídeos derivados do pEMS108 com fusões <i>nifA::lacZ</i>	179
9	Ativação da expressão de fusões <i>nifA::lacZ</i> em <i>E. coli</i>	180
10	Distribuição de nucleotídeos (G + C) nos codons utilizados nos genes <i>nifA</i> e <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> .	181
11	Comparação do uso de codons de <i>H. seropedicae</i> , <i>A. brasiliense</i> e <i>E. coli</i>	182

LISTA DE ADENDOS

1	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS INDIVIDUAIS.....	250
2	SEQUÊNCIA DA REGIÃO "POLYLINKER" DOS PLASMÍDEOS pTZ18 E pTZ19.....	264

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	= 5'-difosfato de adenosina
ATP	= 5'-trifosfato de adenosina
bis-acrilamida	= N,N'-metileno-bis-acrilamida
°C	= graus Celsius
Cb ^R	= resistente à carbenicilina
CI	= Curie
μCI	= microCurie
cm	= centímetro
Cm ^R	= resistente ao cloranfenicol
dATP	= 5'-trifosfato de 2'-desoxiadenosina
dCTP	= 5'-trifosfato de 2'-desoxicitidina
ddATP	= 5'-trifosfato de 2',3'-didesoxiadenosina
ddGTP	= 5'-trifosfato de 2',3'-didesoxicitidina
ddGTP	= 5'-trifosfato de 2',3'-didesoxiguanosina
ddNTP	= 5'-trifosfato de 2',3'-didesonucleosídeos
ddTTP	= 5'-trifosfato de 3'-desoxitimidina
DEAE-celulose	= dietilaminoetila celulose
dGTP	= 5'-trifosfato de 3'-desoxiguanosina
dNTP	= 5'-trifosfato de 2'-desonucleosídeos
dTTP	= 5'-trifosfato de timidina
DMS	= dimetil sulfato
DNA	= ácido desoxirribonucleico
D.O. ₂₆₀	= densidade ótica a 260 nm

D.O. ₂₈₀	= densidade ótica a 280 nm
D.O. ₄₂₀	= densidade ótica a 420 nm
D.O. ₅₄₀	= densidade ótica a 540 nm
D.O. ₆₀₀	= densidade ótica a 600 nm
e	= base dos logaritmos neperianos (2,7182)
e ⁻	= elétron
EDTA	= ácido etilenodiamino-tetra-acético
EPR	= ressonância de elétron paramagnético
g	= grama
μ g	= micrograma
GOGAT	= glutamato sintase
GS	= glutamina sintetase
h	= hora
kb	= kilobase, 1000 pares de bases
K _m ^R	= resistente à canamicina
l	= litro
μ l	= microlitro
LA	= meio Luria agar
LB	= meio Luria broth
ln	= logaritmo neperiano
M	= molar
μ m	= micrômetro
μ M	= micromolar
M ⁺²	= metal divalente
mg	= milligrama
min	= minuto
ml	= mililitro
mm	= milímetro

mM	= millimolar
mmol	= millimol
MOPS	= ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico
mRNA	= RNA mensageiro
N	= normal
NAD	= nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADP ⁺	= fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	= fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
Nal ^R	= resistente ao ácido nalidíxico
ng	= nanograma
nm	= nanômetro
ORF	= "open reading frame"
PAGE-SDS	= eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
pb	= pares de bases
pH	= -log (concentração de íons H ₃ O ⁺)
PI	= fosfato inorgânico
RNA	= ácido ribonucleico
rpm	= rotações por minuto
s	= segundo
SDS	= dodecil sulfato de sódio
Sm ^R	= resistente à estreptomicina
SSC	= tampão citrato-NaCl
t _{1/2}	= tempo de meia vida
TAE	= tampão Tris-acetato-EDTA
TBE	= tampão Tris-borato-EDTA

Tc ^R	= resistente à tetraciclina
TEMED	= (N,N,N',N'-tetrametil)-etilenodiamina
Tris	= tris(hidroximetil)-aminometano
T _x E _y	= tampão Tris.HCl x mM, EDTA y mM (pH 8,0)
U	= unidade (enzimática)
UAS	= "upstream activating sequence"
V	= Volt
v/v	= volume por volume
W	= Watt
w.t.	= estirpe selvagem
Y	= base pirimidínica

RESUMO

A partir de um banco de genes de Herbaspirillum seropedicae construído no cosmídeo vetor pVK102 foi isolado o gene nifA daquele organismo por complementação do mutante FP10 nifA⁻ de Azospirillum brasiliense. O plasmídeo recombinante pEMS1, contendo o gene nifA de H. seropedicae, foi identificado e caracterizado. Este plasmídeo não complementou os mutantes FP8 e FP8 (ntrC⁻), FP3 (nifHDK⁻) e FP6 (deficiente na produção de proteína MoFe). O fragmento Sal I de 2,0 kb do plasmídeo pEMS1 hibridizou fortemente com o gene nifA de Klebsiella pneumoniae, mas não com os genes nifHDK de A. brasiliense. A região que continha o gene nifA de H. seropedicae foi mapeada numa extensão de aproximadamente 2,0 kb do plasmídeo pEMS1 por subclonagem e por hibridização. Nesta região e em suas adjacências foi demonstrado, após sequenciamento, a presença de uma ORF homóloga aos genes nifA de outros organismos e de uma ORF parcial correspondente ao gene nifB de H. seropedicae. A proteína NifA de H. seropedicae deduzida a partir da sequência de nucleotídeos possui alta homologia com outras proteínas NifA nos domínio D e E. Foi identificado ainda um interdomínio homólogo àquele presente nas proteínas NifA de Bradyrhizobium japonicum, Rhizobium spp., Azorhizobium caulinodans. Sítios de ligação para NtrC e NifA e promotores

-24/-12 foram identificados na região promotora do gene nifA de H. seropedicae. Após o gene nifA foi identificado também o gene nifB de H. seropedicae. A região N-terminal da proteína NifB de H. seropedicae possui alta homologia com as de B. japonicum e Azotobacter vinelandii. Dois sítios de ligação para NifA e um promotor -24/-12 foram identificados na região promotora do gene nifB de H. seropedicae. Com base nos dados da sequência de nucleotídeos dos gene nifA e nifB de H. seropedicae e nos resultados de fusões nifA::lacZ foi construído um modelo hipotético para a regulação da fixação de nitrogênio em H. seropedicae.

1. INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual o dinitrogênio (nitrogênio ou N_2) atmosférico é convertido em amônia. Calcula-se que, de um total de 2×10^8 toneladas por ano, cerca de 60% do nitrogênio fixado no planeta é proveniente da fixação biológica. Isto é de fundamental importância para manter nulo o balanço líquido do ciclo do nitrogênio na terra (219).

A fixação biológica de nitrogênio ocorre somente entre os organismos procarióticos e está largamente difundida entre bactérias e cianobactérias. Espécies fixadoras de nitrogênio estão distribuídas em gêneros taxonomicamente distantes como Bacillus e Klebsiella (219).

Os diazotrofos são divididos em organismos simbóticos, associativos e de vida livre (212). Os diazotrofos simbóticos associam-se com plantas, estabelecendo uma simbiose altamente benéfica, para a qual contribuem com nitrogênio fixado. Esta simbiose é específica sendo que na maioria das vezes um diazotrofo simbótico associa-se a apenas uma espécie de planta. Entre as plantas destacam-se pela sua importância agrônoma os membros da família Leguminosae que se associam com diazotrofos da família Rhizobiaceae, com a formação de nódulos nas raízes. Espécies do gênero Frankia (Streptomycetaceae) nodulam uma variedade de plantas enquanto que cianobactérias diazotróficas

associam-se a fungo, pteridófitas e plantas do gênero *Gunnera* (angiosperma). Entre os fixadores de nitrogênio simbóticos estão espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia* sp. e *Azorhizobium caulinodans* (219). Estas espécies são de grande importância econômica, uma vez que fixam nitrogênio em quantidade suficiente para substituir parcialmente a adubação de culturas associadas com compostos nitrogenados (219,212).

Os organismos associativos, como *Azotobacter paspalum*, *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum seropedicae*, são encontrados na rizosfera de gramíneas e, algumas vezes, no interior das raízes (55). A associação planta-bactéria pode trazer efeitos benéficos para a planta pela produção de fito-hormônios que estimulam o crescimento vegetal e, possivelmente, também através da fixação de nitrogênio. O interesse no estudo deste tipo de diazotrofo tem crescido, em vista do seu uso potencial como biofertilizante para gramíneas como trigo, milho e arroz (55).

Os organismos de vida livre, como *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter* spp. e *Klebsiella pneumoniae*, aparentemente não se associam a plantas e fixam nitrogênio para seu próprio consumo (219).

1.1. O COMPLEXO DA NITROGENASE

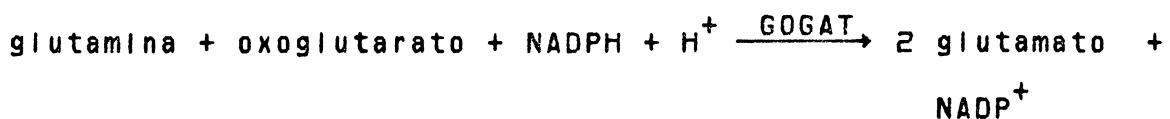
A redução enzimática de dinitrogênio (N_2) a amônia e hidrogênio molecular é catalisada por um complexo enzimático

chamado nitrogenase (N_2 ase).

O complexo enzimático da nitrogenase é constituído por duas proteínas: uma que contém molibdênio e ferro (proteína MoFe ou dinitrogenase) e outra que contém somente ferro (proteína Fe ou dinitrogenase redutase). Nenhuma delas apresenta atividade em separado mas, quando combinadas na presença de Mg.ATP e de uma fonte de baixo potencial de redução catalisam a reação (63,107,219):



A amônia produzida é assimilada pelo organismo via glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (189,219), de acordo com as equações:



A conversão de nitrogênio em amônia é inibida por Mg. ADP mas não por amônia ou seus produtos de assimilação (62).

A proteína MoFe ou dinitrogenase é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, que perde atividade rapidamente em contato com o ar ($t_{1/2}$ de aproximadamente 8-10 minutos). A subunidade α (produto do gene nifQ) possui um peso molecular de aproximadamente 51 kiloDaltons e a subunidade β (produto do gene nifK) cerca de

60 kiloDaltons (63). Cada tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ contém 2 átomos de molibdênio, 24 a 36 átomos de ferro e cerca de 20-26 átomos de enxofre (63). Estes átomos estão agrupados em 2 centros contendo ferro, molibdênio e enxofre e em 4 centros 4Fe-4S denominados centros "P" (63,67,251).

Um complexo sensível a ácido pode ser extraído da proteína MoFe com N-metil formamida (241). Este complexo, denominado cofator ferro-molibdênio (FeMoco), tem fórmula molecular provável $\text{MoFe}_{6-8}\text{S}_{4-6}$ e sua estrutura ainda não foi completamente esclarecida (67,250,251). Mutantes nifV de Klebsiella pneumoniae possuem uma nitrogenase de especificidade alterada, isto é, não reduz N_2 , enquanto acetileno é reduzido normalmente (115). A adição de FeMoco extraído da estirpe selvagem à mesma nitrogenase de mutante nifR, incapaz de sintetizar FeMoco, resulta em uma enzima de especificidade normal. Por outro lado, a adição de FeMoco extraído do mutante nifV à nitrogenase extraída do mutante nifB resulta em uma enzima com características similares àquela do mutante nifV (67, 115). Estes resultados indicam o envolvimento do FeMoco no sítio ativo da nitrogenase. Evidências sugerem ainda que 2 centros ferro-molibdênio (FeMoco) fazem parte de cada tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (63,67,219,251).

A sequência de aminoácidos das cadeias α e β da proteína MoFe de alguns organismos foram determinadas e comparadas. A característica mais conservada entre as proteínas comparadas é a presença de 5 resíduos de cisteína na subunidade α e 3 na subunidade β (113,137,251). Estudos com a proteína MoFe de K. pneumoniae especificamente mutada

Indicam que os resíduos conservados de cisteína 63, 89, 155, 184 e 275 da subunidade α e os resíduos 69, 94 e 152 da subunidade β são importantes para a atividade da proteína MoFe. A substituição do resíduo de cisteína 184 da subunidade α por alanina ainda permite uma pequena taxa de crescimento dependente de N_2 . Da mesma forma, a substituição do resíduo de cisteína 152 da subunidade β por serina, mas não por alanina, produz também uma nitrogenase parcialmente ativa. A substituição de todos os outros resíduos conservados de cisteína por alanina e também a substituição do resíduo cys155 da subunidade α por serina produziram sempre nitrogenase inativa, enquanto que a substituição do resíduo não conservado de cisteína 112 da subunidade β por serina, produziu um fenótipo idêntico ao selvagem (151,251). No mutante ala275 (subunidade α), o FeMoco está ligado mais frouxamente à proteína, indicando que cys275 pode estar envolvido na ligação do cofator ferro-molibdênio (151,251).

A proteína Fe ou dinitrogenase redutase (produto do gene nifH) apresenta-se como um dímero γ_2 de peso molecular variando de 58 a 72 kilodaltons conforme o organismo (63,67,165). Esta proteína é consideravelmente mais sensível à inativação por oxigênio que a proteína MoFe ($t_{1/2}$ sob o ar é cerca de 45 s) (63). A proteína Fe contém quatro átomos de ferro e quatro átomos de enxofre por dímero, possivelmente na forma de um centro 4Fe-4S. Este centro encontra-se entre as duas subunidades, ancorado por resíduos de cisteína (219,63).

A sequência de aminoácidos da proteína ferro é

altamente conservada entre uma variedade de organismos diazotrofos (233). Cinco resíduos de cisteína são especialmente conservados assim como três regiões identificadas como possíveis sítios de ligação de nucleotídeos (63,67).

O modelo de mecanismo de reação da nitrogenase mais aceito é o chamado modelo Lowe & Thorneley, desenvolvido a partir de dados experimentais e simulações em computador da redução de nitrogênio (165,251). Segundo este modelo o mecanismo de redução de N_2 a 2 NH_3 envolve, numa primeira etapa, a redução da proteína MoFe pela proteína Fe reduzida complexada com 2Mg.ATP. Nessa etapa ocorre a hidrólise de ATP e a transferência de um elétron para a proteína MoFe, provavelmente envolvendo a formação de um complexo entre a proteína MoFe e a proteína Fe-(2Mg.ATP). A etapa determinante da velocidade desta reação é a dissociação deste complexo. O ciclo se completa com a redução da proteína Fe oxidada e a troca de Mg.ADP por Mg.ATP. Este modelo prevê que o ciclo de redução da proteína MoFe deve ocorrer oito vezes para que ocorra a redução de N_2 a 2 NH_3 e, neste processo, a redução de H^+ a H_2 é obrigatória. Segundo este modelo, a ligação de N_2 à nitrogenase só pode ocorrer quando a proteína MoFe estiver consideravelmente reduzida (3 ou 4 equivalentes de elétrons) deslocando o H_2 ligado ao FeMoco (165).

1.2. CONTROLE DA ATIVIDADE DA NITROGENASE POR AMÔNIA E OXIGÊNIO

1.2.1. Inibição da nitrogenase por amônia

Em microorganismos como Rhodopseudomonas palustris (268), Azotobacter (40), Azospirillum brasiliense, Azospirillum lipoferum (111,193), Azospirillum amazonense (111), Herbaspirillum seropedicae (91), Rhodopseudomonas capsulata (Rhodobacter capsulatus) (145) e Rhodospirillum rubrum (146) a atividade da nitrogenase é inibida, rápida e reversivelmente, pela adição de amônia às culturas desreprimidas. Este "desligamento" transitório da nitrogenase por NH_4^+ é denominado "switch-off" da nitrogenase (268). Os mecanismos deste fenômeno aparentemente não são os mesmos em todos os organismos que o apresentam.

Em R. rubrum a proteína Fe é rapidamente inativada "in vivo" após a adição de íons amônio. Essa inativação é resultado da ligação de um grupo ADP-ribosílio a uma das duas subunidades idênticas da proteína Fe (146,166,168). A enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosílio-transferase (DRAT) catalisa a transferência do grupo ADP-ribosílio do NAD para a proteína Fe. Esta conversão é ativada por Mg^{+2} -ADP (166,168). A atividade da proteína Fe modificada pode ser recuperada pela remoção do grupo ADP-ribosílio, reação catalizada pela enzima ativadora glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase (DRAG) e requer Mg^{+2} , ATP e Mn^{+2} (101,105). O tipo de sinal ou o mecanismo envolvidos no disparo das atividades de DRAT ou DRAG ainda não foram

esclarecidos. A glutamina também é capaz de provocar inibição reversível da nitrogenase. Além disso, a pré-adição de metilsulfoximina (MSX), um inibidor de glutamina sintetase, a culturas desreprimidas impede a inativação por NH_4^+ . Esses resultados sugerem um possível papel da glutamina sintetase ou da glutamina no controle da inativação reversível da nitrogenase por amônia (77,148). Aparentemente mecanismo similares operam em Rhodopseudomonas capsulata (Rhodobacter capsulatus) (145), A. brasiliense e A. lipoferum (111,93). Os genes draG e draT de A. lipoferum Br17, que codificam para DRAG e DRAT, foram recentemente clonados e mapeados precedendo o promotor dos genes nifHDK (92). Também em A. brasiliense foram identificados os genes draG e draT por hibridização (93).

Em outros organismos tais como Azotobacter vinelandii (161), A. amazonense (111) e H. seropediccae (91) o fenômeno de "switch-off" da nitrogenase pela adição de NH_4^+ é claramente diferenciado. Nesses organismos a inativação da nitrogenase é imediata, sem um período de transição durante o qual os eventos enzimáticos deveriam ocorrer. Assim, o "switch-off" não é inibido por MSX, não ocorre em extrato bruto de culturas desreprimidas e, finalmente, não há evidências para modificação covalente da proteína. Um modelo claro para esse segundo caso de inibição reversível da nitrogenase ainda não foi estabelecido, mas evidências apontam para um efeito indireto, talvez um desequilíbrio na transferência de elétrons para a nitrogenase (161).

1.2.2. Inibição da nitrogenase por oxigênio

Um outro tipo de inibição reversível da nitrogenase tem sido documentado: o chamado "switch-off" da nitrogenase por oxigênio, ocasionado pela elevação repentina e transitória dos níveis de oxigênio em culturas desreprimidas. Após a redução dos níveis de oxigênio a atividade de nitrogenase é recuperada total ou parcialmente na ausência de síntese proteica (58,110). Novamente dois mecanismos diversos parecem operar nos diferentes organismos. A nitrogenase em extrato bruto de Azotobacter precipita como um complexo oxigênio tolerante, que contém um terceiro componente: uma proteína redox chamada Shethna, FeSII ou proteína protetora (107,121,232,266). O complexo nitrogenase-proteína FeSII não apresenta atividade de redução de nitrogênio mas, após a remoção do excesso de oxigênio, a nitrogenase recupera sua atividade. Preparações contendo somente nitrogenase são, ao contrário, irreversivelmente inativadas na presença de oxigênio em alguns minutos. A "proteção conformacional" da nitrogenase (46) pela formação de um complexo resistente à inativação por oxigênio provavelmente envolve mudanças conformacionais da nitrogenase concomitantemente com, ou devido a, mudanças nas suas propriedades redox (121,266).

Em A. brasiliense e A. lipoferum ocorre também uma inibição parcial e reversível da nitrogenase ocasionada por níveis elevados de oxigênio (110). Este "switch-off" por oxigênio, no entanto, aparentemente não envolve a formação de complexo com proteína redox, mas certamente não envolve modificação covalente da proteína Fe (110). Na verdade,

vários diazotrofos, incluindo Klebsiella pneumoniae, apresentam o fenômeno de desligamento da nitrogenase por oxigênio, mas somente em Xanthobacter flavus existe evidências para a formação de complexos resistentes ao oxigênio semelhante àquele de Azotobacter (para revisão ver 121). Este fenômeno de desligamento da nitrogenase por oxigênio possivelmente se deve ao desvio de elétrons da nitrogenase para a cadeia respiratória (98,106). É interessante notar que, ocorre ainda um terceiro tipo de "switch-off" em A. brasiliense e A. lipoferum: "switch-off" por anaerobiose. Quando culturas desreprimida para nitrogenase destes organismos são submetidas à anaerobiose transitória suas atividades de nitrogenase são inibidas, as quais retornam prontamente com o reestabelecimento de níveis de oxigênio adequados à fixação de nitrogênio. Neste caso, a proteína Fe é inativada por modificação covalente de forma semelhante àquela que ocorre em "switch-off" por íons amônio (110).

1.3. MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA NITROGENASE CONTRA OXIGÊNIO

A sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio levou os microorganismos fixadores de nitrogênio a desenvolverem mecanismos de proteção. Organismos anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos são capazes de expressar os genes responsáveis pela síntese da nitrogenase apenas em condições de anaerobiose (121,213). Alguns organismos protegem a

nitrogenase da exposição ao oxigênio por compartmentalização. A cianobactéria Anabaena, por exemplo, desenvolve estruturas diferenciadas, os heterocistos, onde a redução de N_2 a NH_4^+ se processa em condições de anaerobiose (264). Em organismos aeróbicos obrigatórios, entretanto, um rígido controle da tensão de oxigênio é necessário, de forma a fornecer um suprimento suficiente de ATP para a nitrogenase, mas que não exceda os níveis de tolerância ao oxigênio. O melhor exemplo de adaptabilidade a variadas concentrações de oxigênio ocorre em Azotobacter (46,58). Azotobacter é capaz de fixar nitrogênio em altas tensões de oxigênio graças a uma intensa atividade respiratória e a sua capacidade de alterar as concentrações e as atividades de componentes da sua cadeia respiratória ramificada, permitindo uma maior flexibilidade no consumo de oxigênio (46,58,219,266). Em baixos níveis de oxigênio a respiração está perfeitamente acoplada à produção de ATP, mas em altos níveis de O_2 ocorre um desacoplamento parcial da respiração, aumentando o fluxo de elétrons (266). Para que o mecanismo de dissipação de oxigênio via cadeia respiratória seja eficiente o maior fluxo possível de elétrons deve ser dirigido aos diversos ramos da cadeia respiratória existentes na bactéria. Ramos e Robson (223) demonstraram este fato isolando mutantes de A. chroococcum incapazes de crescer utilizando N_2 como fonte de nitrogênio sob atmosfera ambiente (20% O_2) e utilizando sacarose como fonte de carbono, mas que eram capazes de crescer fixando nitrogênio ao ar na presença de ácidos orgânicos (tais como succinato,

fumarato, malato e acetato). Um dos mutantes foi caracterizado como deficiente em fosfoenolpiruvato-carboxilase (225) e um outro em citrato-sintase (224). Estes resultados indicam que o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) funcional é necessário para a proteção respiratória adequada.

Azospirillum spp. e H. seropedicae possuem uma capacidade bastante modesta de conciliar a atividade de nitrogenase com altas tensões de oxigênio, exigindo condições de microaerofilia para exibirem a fixação biológica de nitrogênio (ver 55). Apesar de resultados espectroscópicos sugerirem uma cadeia respiratória ramificada em A. brasiliense (198,213), aparentemente este organismo não é capaz de realizar a proteção respiratória da nitrogenase (191). Neste contexto, um aumento da atividade respiratória foi verificado por Hartmann e Burris (110) mas a atividade da nitrogenase ainda era inibida em resposta ao aumento de oxigênio. De fato, Azospirillum e Herbaspirillum possuem a capacidade de "procurar" regiões do meio ambiente com concentrações de O_2 compatíveis com a atividade da nitrogenase, um fenômeno denominado aerotaxia (7,55,197).

Alguns autores atribuem ainda à superóxido dismutase e à catalase uma função protetora contra o oxigênio (ver 213 para revisão). Entretanto Hochman *et al.* (125) e Higuti e Pedrosa (117) isolaram mutantes de Rhodopseudomonas capsulata e A. brasiliense, respectivamente, superprodutores de catalase, mas que não eram mais tolerantes ao oxigênio do que as estírpes selvagens correspondentes.

1.4. NITROGENASES ALTERNATIVAS

Em *A. vinelandii* e *A. chroococcum* além da nitrogenase dita convencional (Mo nitrogenase) estudos recentes demonstraram a existência de outros dois sistemas alternativos de redução de nitrogênio (15,16,206,207,220). A nitrogenase 2 (V nitrogenase) e nitrogenase 3 (Fe nitrogenase) foram descritas em *A. vinelandii*, em contraposição a nitrogenase 1 (chamada também de nitrogenase convencional ou Mo nitrogenase). Em *A. chroococcum*, por outro lado, as evidências apontam para a existência apenas da nitrogenase 1 e da nitrogenase 2 (148).

O complexo da nitrogenase 2 de *A. chroococcum* é constituído, como na nitrogenase convencional, por duas proteínas: a proteína VFe (dinitrogenase 2), que contém vanádio, ferro e enxofre; e a proteína Fe (dinitrogenase redutase 2), que contém ferro e enxofre (65,66,67,235). Uma característica que distingue este tipo de nitrogenase da convencional é sua capacidade de reduzir acetileno a etileno e etano (49), enquanto que a nitrogenase convencional não é capaz de formar etano. A proteína VFe tem um peso molecular de 210 kilodaltons contendo 2 átomos de vanádio, 23 átomos de ferro e 20 grupos ácido-lábeis de íons sulfeto por molécula e é muito mais sensível à desnaturação por oxigênio ($t_{1/2}$ sob ar de 45 segundos) que a proteína MoFe (66,67). Recentemente a análise da proteína VFe por eletroforese

PAGE-SDS mostrou que esta proteína é constituída de três componentes de 14, 55 e 50 kiloDaltons, formando um hexâmero $\alpha_2\beta_2\delta_2$ (66). A subunidade δ não possui similar na nitrogenase convencional, mas as subunidades α e β são altamente homólogas às subunidades α e β da proteína MoFe (66,237). Um cofator contendo vanádio, ferro e íons sulfetos na proporção 1:6:5 (FeVaco) pode ser extraído da proteína VFe por tratamento com N-metil formamida (252). O FeVaco, supostamente similar ao FeMoco da nitrogenase 1, é capaz de complementar bioquimicamente a nitrogenase do mutante nifB de K. pneumoniae conferindo, inclusive, a capacidade de reduzir acetileno a etano (66,67).

A dinitrogenase redutase ou proteína Fe da V nitrogenase é muito similar àquela da Mo nitrogenase. Esta proteína é constituída por um dímero γ_2 , de peso molecular de cerca de 62-64 kiloDaltons. Cada dímero contém 4 átomos de ferro e 4 grupos sulfeto ácido-labeis. Espectroscopia de EPR indica que, como na proteína ferro da nitrogenase convencional, estes átomos formam centros 4Fe-4S (64,65).

A V nitrogenase também requer Mg.ATP e um a fonte de elétrons de baixo potencial como cofatores para a redução de N_2 (260).

Recentemente, o segundo sistema de fixação alternativa de nitrogênio foi identificado em A. vinelandii e tem sido intensamente estudado (44,206,207). Aparentemente A. chroococcum não possui esta terceira nitrogenase (148).

O complexo ativo da nitrogenase 3, a exemplo das anteriores, consiste de 2 componentes: a dinitrogenase 3 e a

dinitrogenase redutase 3. A dinitrogenase 3, por sua vez, é constituída pelas subunidades α (58 kilodaltons) e β (50 kilodaltons). Estas subunidades aparentemente se agrupam em duas configurações ativas: $\alpha_2\beta_2$ (216 kilodaltons) e $\alpha_1\beta_2$ (158 kilodaltons). A dinitrogenase 3 não contém quantidades significativas de molibdênio (0,12 atm g/mol) ou vanádio (>0,01 atm g/mol), mas possui ferro. A configuração $\alpha_2\beta_2$ contém 24 átomos de ferro e 18 íons sulfeto ácido-lábeis, enquanto que a configuração $\alpha_1\beta_2$ contém 11 átomos de ferro e 9 íons sulfeto (44). Possivelmente uma terceira cadeia polipeptídica (subunidade δ) também faça parte da dinitrogenase 3. Neste contexto, o sequenciamento dos genes estruturais da nitrogenase 3 de *A. vinelandii* mostrou que existe uma ORF entre os genes anfD (subunidade α) e anfK (subunidade β) que codifica para uma cadeia polipeptídica altamente homóloga àquela da subunidade δ da nitrogenase 2 de *A. chroococcum* (143). A dinitrogenase redutase 3 é muito semelhante àquela do complexo da nitrogenase 1. Esta proteína consiste de duas subunidades idênticas de peso molecular 32,5 kilodaltons e contém 4 átomos de ferro e 4 íons sulfeto por dímero de 65 kilodaltons (44).

1.5. GÉNETICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

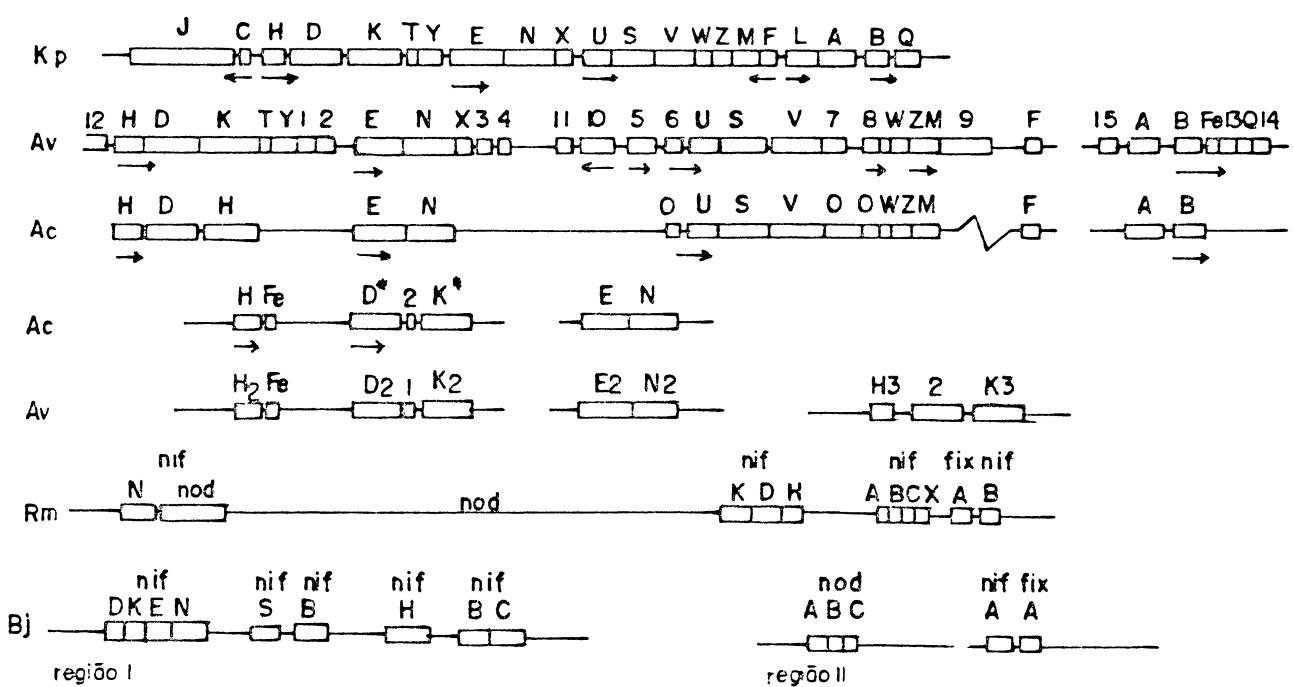
1.5.1. Genes nif em *K. pneumoniae*

Em *K. pneumoniae*, o organismo melhor estudado em termos de genética da fixação de nitrogênio, são necessários 21

genes para a expressão da capacidade de fixar nitrogênio. Estes genes estão organizados em um grupo contíguo de 8 operons, ocupando uma extensão de 23 kilobases (kb) do genoma (4,50,178) (figura 1). O agrupamento de genes nif está localizado entre o operon his e o locus shik (shikimato permease) na seguinte ordem: his nif shik (169). Com exceção dos operons nifF e de nifGJ todos os demais são transcritos na mesma direção do operon his. Apenas os transcritos originados do promotor nifF e do promotor de nifM são monocistrônicos (38,50,208). Três genes codificam para os três polipeptídeos que compõem o complexo da nitrogenase: nifH determina a proteína Fe, enquanto os genes nifD e nifK são responsáveis pelas subunidades α e β da proteína MoFe, respectivamente (229). Experimentos de hibridização de DNA interespécies e comparação de sequência de aminoácidos mostraram que os genes nifH e nifD de espécies taxonomicamente distantes são consideravelmente conservados, enquanto que o grau de homologia entre genes nifK de diferentes espécies é menor (63,174,234,238).

Outros genes são ainda necessários para que o complexo da nitrogenase apresente atividade. Mutantes nifM de *K. pneumoniae* produzem uma dinitrogenase redutase inativa, sugerindo que a proteína NifM seja importante para o processamento dessa enzima (229). Howard *et al.* (132) e Paul e Merrick (209,210) demonstraram que somente os genes nifH e nifM de *K. pneumoniae* carregados por um plasmídeo são necessários e suficientes para a síntese de dinitrogenase redutase ativa em *Escherichia coli*. Além disso, estírpes de

FIGURA 1 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES nif EM *K. pneumoniae*: A. *vinelandii*, A. *chroococcum*, R. *meliloti* e B. *japonicum*



Kp, *K. pneumoniae*; Av, A. *vinelandii*; Ac, A. *chroococcum*; Rm, R. *meliloti* e Bj, B. *japonicum*. Os genes nif de A. *chroococcum* marcados com * referem-se aos da V nitrogenase, enquanto que aqueles de A. *vinelandii* marcados 2 e 3 referem-se aos da V e Fe nitrogenase, respectivamente. Os esquemas foram adaptados de Merrick *et al.* (178), Jacobson *et al.* (138) e Kennedy (148).

K. pneumoniae com deleções nos genes nifWZ (presente no mesmo operon que o gene nifM) foram capazes de reduzir acetileno e de crescer em meio sem nitrogênio fixado (209,210). Especula-se que a função do produto do gene nifM seria a de estabilizar a proteína Fe ou participar em alguma etapa de sua ativação (132). Por outro lado, Jacobson *et al.* (138) mostraram que estirpes de *A. vinelandii* com deleções cromosomais AnifU e AnifS tinham baixíssimos níveis de dinitrogenase redutase ativa e cerca de 1/3 de atividade de proteína MoFe da estirpe selvagem. Roberts *et al.* (229) já haviam observado que mutantes nifS de *K. pneumoniae* apresentavam apenas traços de atividade de dinitrogenase redutase. Estes resultados são aparentemente conflitantes com aqueles obtidos por Paul e Merrick (209,210). Jacobson *et al.* (138) especularam que alguma proteína de *E. coli* pudesse substituir os produtos dos genes nifUS e, além disso, argumentam que a atividade de dinitrogenase redutase obtida por Paul e Merrick (210) foi menor que a esperada para a dose de gene usada.

Uma espécie inativa da dinitrogenase redutase contendo apenas 2 átomos de ferro pode ser obtida pelo tratamento com o quelante $\alpha\alpha'$ -bipiridil e Mg.ATP. Esta espécie é reativada pelo tratamento com uma sulfotransferase de mamífero na presença de tiossulfato, citrato de ferro e lipoato reduzido (202). O núcleo inicial de ferro, apesar de inativo, é necessário para a reativação. Os autores sugeriram que o produto de nifM possa agir como uma sulfotransferase nif-específica na ativação da dinitrogenase redutase (202).

Mutantes nifB, nifE e nifN de K. pneumoniae são complementados "in vitro" pelo FeMoco, indicando que estes genes estão envolvidos na biossíntese deste cofator (229). A sequência de aminoácidos dos genes nifEN de K. pneumoniae (4), A. vinelandii (22) e R. meliloti (1) deduzida a partir de sequência de DNA revelou-se homóloga àquela dos genes nifDK. Os autores sugerem que as proteínas NifE e NifN formariam um complexo no qual o FeMoco ficaria ancorado durante sua síntese e/ou para sua transferência para a apo-dinitrogenase (1,22). De fato as proteínas NifE e NifN de K. pneumoniae são co-purificadas na forma de um complexo sensível ao ar e com peso molecular aproximado de 210 kiloDaltons, provavelmente um tetrâmero de composição $\alpha_2\beta_2$ (242). A análise das sequências de aminoácidos da proteína NifB de diversos organismos revelou um grupo de resíduos de cisteína (cys-x₃-cys-x₂-cys-x₅cys) altamente conservado (35,141). Este agrupamento de resíduos de cisteína é bastante semelhante àqueles que aparecem em proteínas que ligam grupos ferro-enxofre tais como ferredoxinas (35). Esta característica e sua alta sensibilidade ao oxigênio sugerem que a proteína NifB participe de reações redox durante a síntese do FeMoco (242).

Mutantes nifV de K. pneumoniae são capazes de reduzir acetileno a etileno mas incapazes de reduzir N₂ a NH₃ (115), indicando o envolvimento do produto de nifV com a síntese do sítio ativo da nitrogenase. Posteriormente, se verificou que o produto de nifV era necessário para a síntese de um fator de baixo peso molecular que se acumulava em culturas

selvagens desreprimidas para nitrogenase, mas não em culturas dos mutantes nifV. Este fator foi identificado como homocitrato e, portanto, o produto de nifV foi sugerido como sendo a enzima homocitrato sintase (130,131). Resultados recentes indicam que o homocitrato é incorporado ao FeMoco, conferindo-lhe características de especificidade (129,242). O produto de gene nifQ também está envolvido na biossíntese do FeMoco, possivelmente na captura e transporte de molibdênio (136). Mutantes nifQ de *K. pneumoniae* e de *A. vinelandii* apresentam fenótipo Nif^- , que pode ser corrigido com um excesso de molibdênio no meio de cultura (136,141). Comparação das sequências de aminoácidos das proteínas NifQ destes organismos revelou um grupo de resíduos de cisteínas na porção C-terminal, sugerindo novamente um sítio de ligação de metal (141).

Além desses genes, os produtos dos genes nifH, nifU, nifS, nifW, nifZ e nifM (83,84,138,229,230,231) parecem estar envolvidos na maturação da proteína MoFe. Vários mutantes nifH⁻ de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* são incapazes de sintetizar o FeMoco (83,84,229,230,231), indicando que o produto do gene nifH é, de alguma forma, importante durante a síntese deste cofator. Entretanto é interessante notar que a função da proteína NifH na síntese do FeMoco é independente da sua atividade de dinitrogenase redutase uma vez que: a)mutantes nifM são incapazes de produzir dinitrogenase redutase ativa, mas são capazes de sintetizar FeMoco (229); b)mutantes de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* com deleção parcial do gene nifH, produz uma

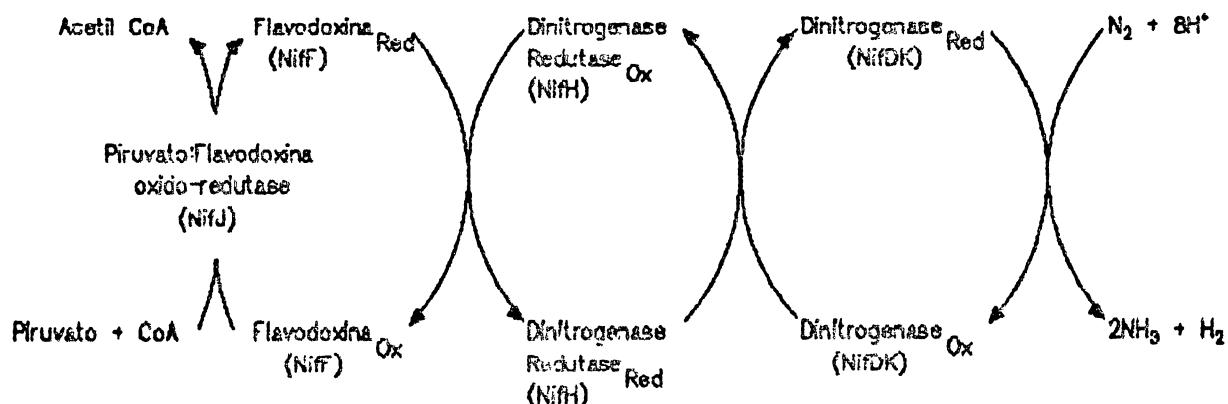
dinitrogenase redutase incapaz de transferir elétrons mas ainda sintetiza o FeMoco (83,84,231,253); e c) dinitrogenase redutase ADP-ribosililada é eficiente na síntese de FeMoco (135,242). Especula-se que proteína NifH possa atuar como uma fonte de baixo potencial redutor doando elétrons para a formação de um intermediário do FeMoco (84,242,253).

O requerimento dos produtos dos genes nifE, nifN, nifB, nifH e nifV para a biossíntese do FeMoco é corroborado pelo fato de que a sua síntese "in vitro" requer molibdato, ATP, as proteínas NifB, NifE, NifN, dinitrogenase redutase e ainda homocítrato (135,242).

A função dos genes nifU, nifS, nifW, nifZ e nifM na biossíntese do FeMoco ainda não está completamente estabelecida. Mutantes ΔnifUS de *A. vinelandii* possuem cerca de 8% da atividade de dinitrogenase, enquanto mutantes ΔnifU ou ΔnifS apresentam cerca de 25-30% de atividade da dinitrogenase (138). Roberts et al. (229) descreveram mutantes nifS de *K. pneumoniae* com atividade de dinitrogenase sensivelmente diminuída, mostrando que as proteínas NifS e NifU são importantes para a síntese de uma proteína MoFe ativa. A proteínas NifS e NifU provavelmente atuam indiretamente na síntese do FeMoco uma vez que ambas são importantes para a ativação ou estabilização da dinitrogenase redutase (138). Assim a incapacidade de síntese de uma proteína MoFe ativa poderia ser devido ao acúmulo de dinitrogenase redutase inativa, o que é corroborado inclusive pelo efeito cumulativo da dupla deleção ΔnifUS em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* (138,229).

Mutantes *AnifM*, *AnifZ* ou *AnifW* de *A. vinelandii* apresentaram atividade de proteína MoFe diminuídas (cerca de 30-50% da atividade da estirpe selvagem) enquanto que o mutante *AnifZM* possui atividade de proteína MoFe insignificante (138).

O produto de *nifF* é uma flavodoxina que transporta elétrons do produto do gene *nifJ*, uma piruvato:flavodoxina óxido redutase, para a dinitrogenase redutase (122,194,229,243), de acordo com o seguinte esquema (38):



As funções dos produtos dos genes *nifG*, *nifI*, *nifY* e *nifX* ainda são desconhecidas, embora as proteínas NifY e NifX compartilhem de um considerável grau de homologia e especula-se que ambas possam ter funções semelhantes em relação aos produtos dos genes *nifDK* e *nifEN*, respectivamente (178). Entretanto, recentemente foi reportado que o produto do gene *nifX* atua como um repressor de transcrição de genes *nif* (100). O produto dos genes *nifL* e *nifA* atuam como repressor e ativador, respectivamente, da expressão dos demais operons *nif* (26,123,181).

1.5.2. Genes nif em Rhizobium e Bradyrhizobium

Genes nif têm sido identificados em Rhizobium e Bradyrhizobium por homologia com genes nif de K. pneumoniae e também por comparação de sequências de genes contíguos a genes nif (figura 1). Os genes essenciais à fixação simbiótica e que não possuem análogos em K. pneumoniae são denominados genes fix.

A localização dos genes nif em Rhizobium é muito variada. Em Rhizobium de crescimento rápido como R. meliloti, R. leuminosarum bv. phaseoli, bv. viciae e trifoli, os genes nif ocorrem em megaplasmídeos (164), denominados plasmídeos simbióticos (pSym). Já em Bradyrhizobium japonicum, esses mesmos genes são de origem cromosomal (164).

Em R. meliloti, a espécie de Rhizobium melhor estudada em termos da genética da fixação de nitrogênio, 7 genes nif já foram identificados (164). Os genes nifHDK, a exemplo do que ocorre em K. pneumoniae, formam um único operon. O gene nifE, localizado após o gene nifK, é transcrito na mesma direção e não faz parte do mesmo operon que o gene nifN, situação em que diferem os genomas de R. meliloti e de K. pneumoniae. O gene nifN, por sua vez, foi localizado nas proximidades de um grupo de genes nod, a cerca de 30 kb do operon nifHDK (164). Precedendo o operon nifHDK e transcrito em direção oposta, estão os operons fixABCX, nifA e nifBfixY (36,68,155). Os genes nif identificados até agora são consideravelmente homólogos àqueles de K. pneumoniae e, supostamente, têm a mesma função. Comparações das sequências

de aminoácidos deduzidas a partir das ORF fixX e fixY indica que estes genes codificam para proteínas semelhantes a ferredoxinas e, portanto, podem estar envolvidas no transporte de elétrons para a nitrogenase (68,155). O produto do gene fixY é essencial para fixação de nitrogênio em simbiose (155). Apesar de não ter sido encontrada homologia das proteínas FixA, FixB e FixG com ferredoxinas, especula-se que suas funções também estejam relacionadas com o transporte de elétrons (68). Recentemente foi identificado, em R. meliloti, um novo grupo de genes relacionados com a fixação de nitrogênio: os genes fixGHIS, organizados em um único operon. Comparações de sequências de aminoácidos sugerem que as proteínas codificadas por estes genes estão ligadas à membrana, formando um complexo que acopla reações de óxido-redução com o transporte de íons (164).

A organização dos genes da fixação de nitrogênio em R. leguminosarum bv. viciae é semelhante àquela de R. meliloti. Os operons nifHDKE, nifA, nifB e fixABCX são conservados nessas duas espécies (164). Entretanto, o gene fixW foi localizado em R. leguminosarum bv. viciae precedendo o operon fixABCX e transcrito na mesma direção. Ainda não se identificou gene homólogo em R. meliloti (128).

Em R. japonicum, os genes estruturais da nitrogenase estão dispostos em dois operons, nifDK e nifH, separados entre si por 17 kb. Logo após o operon nifDK estão localizados os genes nifEN, aparentemente transcritos na mesma direção (69). Entre os genes nifN e nifH encontram-se

ainda mais dois operons: nifS e nifBfrxA. A proteína codificada pelo gene frxA é semelhante à ferredoxina I de R. palustris e parece estar envolvida no transporte de elétrons, mas não é essencial para a fixação de nitrogênio em vida livre (70). Cerca de 2 kb após o operon nifH, foi identificado o operon fixBCX (70,103). Todos estes três últimos genes são essenciais para fixação de nitrogênio em R. japonicum (70,103).

Em um segundo agrupamento de genes nif/fix do cromosoma de R. japonicum foram identificados, nas proximidades de genes nod, os operons fixRNifA e fixA (148,258). A função do gene fixR ainda não foi definida e o produto de fixA é essencial para a fixação de nitrogênio simbótico e em vida livre em R. japonicum (103,258).

Nos gêneros Rhizobium, Bradyrhizobium e Azorhizobium, além dos genes relacionados diretamente com a capacidade de fixar nitrogênio, ocorrem ainda genes responsáveis pelos fenômenos de nodulação e quimiotaxia e pela especificidade de faixa hospedeira. Estes genes são denominados nod (nodulação) e hsn ("host-specific nodulation").

1.5.3. Genes nif em Azotobacter

1.5.3.1. Genética da nitrogenase convencional

A análise genética dos genes nif em A. vinelandii e A. chroococcum mostra que sua organização é semelhante àquela de K. pneumoniae (figura 1). Os grupos de genes nifHDKTY, nifENX, nifUSV, nifWZM e nifE são conservados, apesar de não estarem tão intimamente agrupados como os de K. pneumoniae.

(74,138,148,149,150,178). O grupo nifABQ também é conservado mas está separado por cerca de 20 kb do agrupamento principal (141). Contudo cerca de 15 novas ORF's, que não possuem homólogos em *K. pneumoniae*, ocorrem inter e intra-operons nif de *Azotobacter vinelandii* (138,141). Ainda não se conhece a função destes possíveis novos genes nif, embora evidências estruturais indiquem que a expressão destes genes seja controlada por promotores nif específico (promotor -24/-12) e que possuem sítio de ligação para a proteína NifA (138). Por outro lado Jacobson *et al.* (138) demonstraram que as ORF's 5, 8, 7, 8 e 9 não são essenciais para o crescimento diazotrófico de *A. vinelandii*. Regiões homólogas à ORF8 foram identificadas em *R. capsulatus*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Anabaena*. Homologia com a ORF8 também foi encontrada em *R. capsulatus* (138).

Nenhum gene homólogo ao gene nifJ de *K. pneumoniae* foi encontrado em *Azotobacter*. Por outro lado experimentos de hibridização mostraram que existe um agrupamento de genes homólogos aos genes fixABC de *Rhizobium* (74,103). A função destes genes em *Rhizobium* é desconhecida, mas especula-se que possam estar envolvidos no transporte de elétrons para a nitrogenase (68,74,103).

1.5.3.2. Genética das nitrogenases alternativas

Os genes que codificam para a nitrogenase 2, a vanádio nitrogenase, são denominados vnf, enquanto que os genes da nitrogenase 3, a ferro nitrogenase, são denominados anf. Muitos destes genes também foram clonados e sequenciados. Os

genes estruturais da nitrogenase 2 são ynfH, codifica para subunidade γ da dinitrogenase redutase 2, e os genes ynfD e ynfK, codificam para as subunidades α e β da proteína VFe. Ao contrário daqueles da nitrogenase 1, estes genes não estão localizados em um único operon, mas em dois operons, ynfH e ynfDGK, separados entre si por cerca de 2,5 kb (178,235,236,237). Além disso, no mesmo operon de ynfH foi encontrada uma ORF que codifica para um ferredoxina (235). Entre os genes ynfD e ynfK está localizado o gene ynfG que codifica para a subunidade δ da proteína VFe (236,237). Os genes ynfEN, homólogos aos genes nifEN, também foram identificados e provavelmente estão envolvidos na maturação da proteína VFe (178). Por outro lado, dados fisiológicos e genéticos indicam que existe apenas uma cópia dos genes nifM (relacionado à maturação da dinitrogenase redutase), nifB (relacionado à maturação de dinitrogenase) em *A. vinelandii* e *A. chroococcum* (74,141,149). Estes resultados sugerem que os produtos destes genes participam de um etapa de maturação da nitrogenase que é comum para a nitrogenase 1 e nitrogenase 2 de *A. chroococcum* e *A. vinelandii* e, provavelmente, também para a nitrogenase 3 de *A. vinelandii* (74,141,149). Estudos recentes indicam ainda que existe apenas uma cópia dos genes nifUSV em *Azotobacter vinelandii*, e que estão relacionados com as três nitrogenases (263).

Os genes estruturais da nitrogenase 3 de *A. vinelandii* estão organizados em um único operon (anfHDGK) (143).

Dois genes homólogos ao gene nifA, (ynfA e anfA), foram recentemente identificados e sequenciados em *A. vinelandii*.

os quais aparentemente estão relacionados com a ativação da transcrição dos genes das nitrogenases 2 e 3, respectivamente (142).

1.5.4. Genes nif em Azospirillum

Quiviger *et al.* (222) observaram homologia entre DNA de A. brasiliense e de A. lipoferum e os genes nifHDK de K. pneumoniae. Um fragmento Eco RI de 6,7 kb contendo os genes nifHDK de A. brasiliense foi então clonado. Este fragmento é capaz de hibridizar com os genes nifHDK de K. pneumoniae e de complementar um mutante nifHDK de A. brasiliense (140,190,222).

O mapeamento do fragmento contendo os genes nifHDK de A. brasiliense por inserção com o transposon Tn5 mostrou que estes genes são transcritos como um único operon com início de transcrição em nifH (216). Fragmentos de DNA contíguos aos genes nifHDK de A. brasiliense foram clonados, compreendendo uma região de cerca de 30 kb (71,95). Neste fragmento o mapeamento por Tn5 mostrou a existência de quatro novas regiões nif: a) região II, contendo um gene homólogo ao gene nifE de K. pneumoniae e de A. caulinodans; b) região III, onde mutantes insercionais têm fenótipo Nif- em meio semi-sólido, mas ainda possuem atividade de nitrogenase em meio líquido suplementado com glutamato; c) região IV, que apresenta homologia aos genes nifUS de K. pneumoniae, mas não aos genes nifV e nifM; e d) região V, que apresenta homologia aos genes fixABC. Além destas regiões Gallimand *et al.* (95) detectaram homologia entre DNA

de *A. brasiliense* e o gene nifB de *B. japonicum*. Este gene, porém, não faz parte de cluster nif principal. Os dados disponíveis a respeito da organização dos genes nif em *A. brasiliense* indicam uma semelhança com aquela de *K. pneumoniae* e, principalmente, de *A. vinelandii* e *A. chroococcum*. Os genes nif identificados até agora estão agrupados de forma similar aos de *Klebsiella* e *Azotobacter*, mas, a exemplo de *Azotobacter*, tais genes estão separados por trechos de DNA relativamente longos. Ainda como *Azotobacter* o gene nifB e possivelmente o gene nifA, não estão localizados no cluster principal, enquanto os genes fixABC estão. Por outro lado, Singh *et al.* (248) isolaram 3 mutantes Nif^- por inserção com $Tn5$, e após clonagem e caracterização destas regiões verificaram que não faziam parte do agrupamento principal e eram diferente entre si. Nenhuma destas regiões hibridizou com os genes nifHDK de *A. brasiliense* ou com os genes nifQ, nifAB, ntrC ou glnA de *K. pneumoniae*. Um desses mutantes foi caracterizado como nifA^c com base em complementação com o plasmídeo pCK3 (nifA^c). Estes autores sugeriram que existem pelo menos 4 diferentes regiões do genoma de *A. brasiliense* que contém genes nif. Fahsold *et al.* (75) relataram a clonagem dos genes nifHDK de duas estírpes de *A. lipoferum* e determinaram que sua estrutura era semelhante àquela descrita para *A. brasiliense*. Os genes draG e draT de *A. lipoferum* também foram clonados e mapeados precedendo os genes nifHDK. Na região entre nifHDK e draGT foi identificada uma região homóloga ao gene nifJ de *K. pneumoniae* (92).

1.6. REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

1.6.1. Regulação da fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae*

O complexo da nitrogenase só é sintetizado em *K. pneumoniae* em condições de anaerobiose e em concentrações limitantes de nitrogênio. A repressão da síntese do complexo ocorre quando a bactéria é crescida na presença de amônia (262) ou na presença de oxigênio (62,118,119).

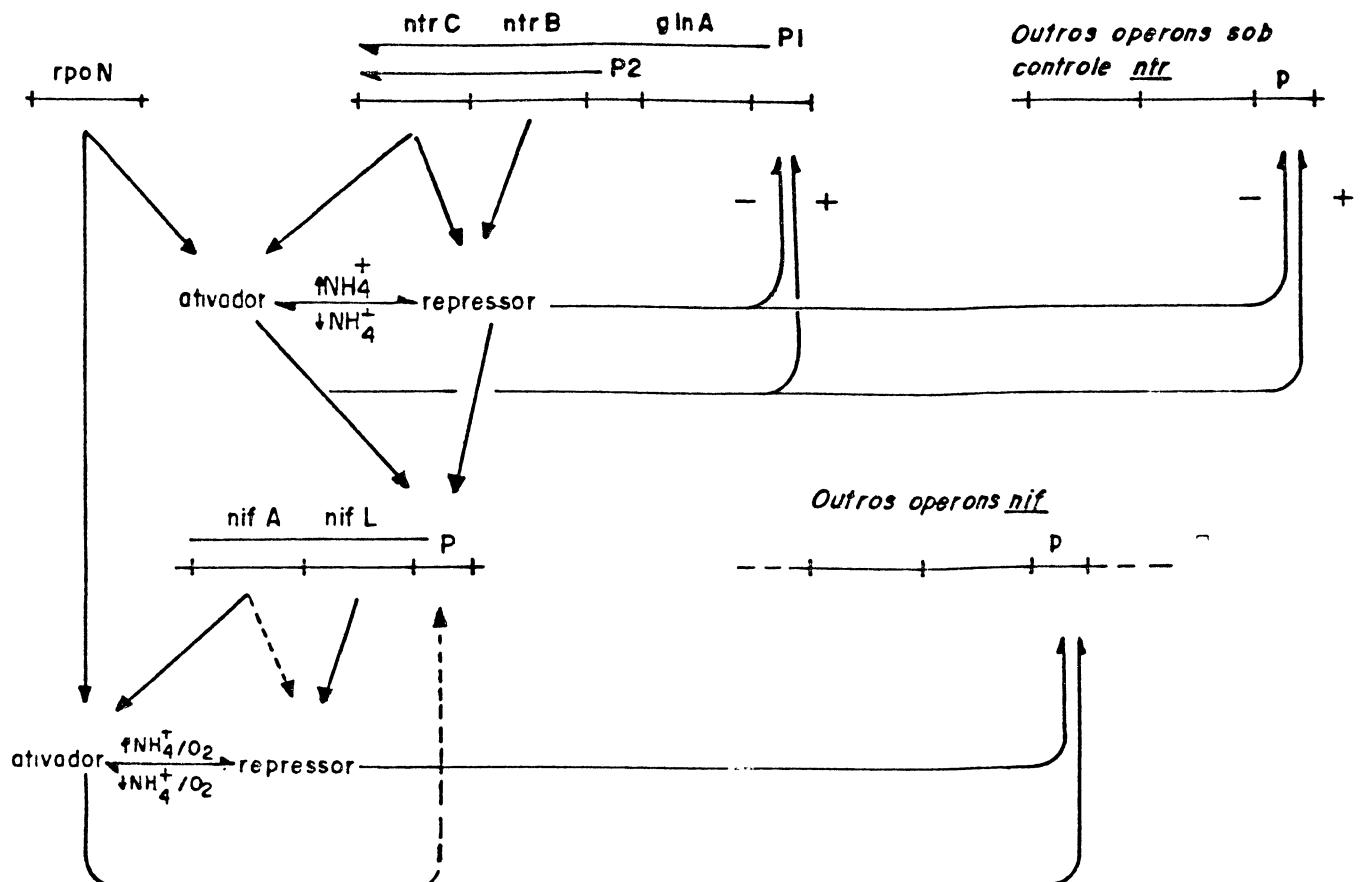
Strelcher *et al.* (256) isolaram mutantes de *K. pneumoniae* com níveis constitutivos de glutamina sintetase (GS) e que expressavam nitrogenase, mesmo na presença de altos níveis de amônia. Os mesmos autores também isolaram mutantes auxotrofos para glutamina que eram incapazes de desreprimir a nitrogenase. Além disso, vários mutantes incapazes de sintetizar GS apresentavam efeito pleiotrópico na utilização de compostos nitrogenados em condições de limitação de nitrogênio, o que levou a hipótese de que a repressão por amônia seria mediada pela GS (170,171). Esta linha de evidências apoiava a idéia de que a GS seria um ativador da síntese da nitrogenase. Contudo, a descoberta de um segundo gene, *ntrG* (*ginG*), ligado a *ginA*, gene estrutural da glutamina sintetase, em *E. coli* (204), em *Salmonella typhimurium* (159) e em *K. pneumoniae* (72,162) levou ao abandono desta hipótese. Mutantes *ntrG* não são auxotrofos para glutamina, têm baixo nível de GS, cuja síntese não é regulada por NH_4^+ , mas exibem um efeito pleiotrópico sobre a

utilização de outras fontes de nitrogênio (72,162). Este efeito, observado anteriormente para alguns mutantes ginA, pode então ser explicado como um efeito polar da mutação em ginA sobre o gene ntrC (72,162).

Posteriormente ficou claro que o operon ginAntrBC (ginALG) controlava a síntese da glutamina sintetase e o metabolismo geral de nitrogênio, incluindo a fixação de nitrogênio (73,176). O produto do gene ntrC pode agir tanto como ativador quanto como repressor, dependendo da disponibilidade de nitrogênio e da sequência do promotor com qual interage (51,114,195,203) e sua atividade é modulada pelo produto do gene ntrB (195).

Estudos posteriores mostraram que a fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae* é regulada em dois níveis (figura 2): a) pelo sistema de regulação geral de nitrogênio (ntr); e b) pelo sistema de regulação nif específico, mediado pelos produtos dos genes nifA (ativador) e nifL (repressor) (59,176,199). Sob condições não repressivas (baixas concentrações de NH_4^+), a proteína NtrC ativa a transcrição do operon nifLA, mas não dos outros operons nif (59,176,199). Entretanto, Buck (27) verificou baixos níveis de ativação do promotor nifH de *K. pneumoniae* por NtrC. A proteína NifA, por sua vez, é o ativador específico da transcrição de todos os operons nif (inclusive nifLA) (26,59,199). Esta proteína é capaz ainda de substituir o produto do gene ntrC na ativação de alguns operons relacionados com o metabolismo de nitrogênio como os genes de utilização de histidina (hutUH), arginina e de prolina,

FIGURA 2 - MODELO PROPOSTO PARA O CONTROLE DO REGULON nif EM *K. pneumoniae*



Modelo de regulação da fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae* (176). O produto do gene ntrC é uma proteína ativadora que, uma vez fosforilada por NtrB, ativa a transcrição do gene nifA. O produto do gene nifA por sua vez ativa a transcrição de todos os operons nif. Sob condições de excesso e amônia e/ou oxigênio o produto do gene nifL inativa a proteína NifA, impedindo a transcrição dos genes nif. O promotores ativados por NifA e NtrC são do tipo -24/-12 e dependem do fator sigma RpoN.

quando expresso constitutivamente em plasmídeo de alto número de cópias (176). As proteínas NifA e NtrC exercem suas funções ativadoras interagindo com sequências de DNA que precedem o início de transcrição em cerca de 100 pb (32,51,226,227). Estas sequências são conhecidas como sítios de ligação específicos para NifA ou UAS ("upstream activating sequence") e sítio de ligação para NtrC (32,52,226,227). As proteínas NifA e NtrC requerem ainda uma classe especial de promotores. As estruturas destes promotores, e os sítios de ligação das proteínas ativadoras bem como o provável mecanismo de ativação serão descritos com detalhes oportunamente.

A síntese da nitrogenase é inibida por amônia e/ou oxigênio. A repressão da síntese da nitrogenase por níveis intermediários de amônia (cerca de 4 mM) ou pela presença de oxigênio envolve o produto de nifL (85,123,181), enquanto que a repressão por altos níveis de amônia (> 10 mM) é mediada pelo sistema ntr (39). Dados sobre as velocidades de transcrição e de tradução de genes nif indicam que o sítio de controle da síntese da nitrogenase é transcripcional e não traducional (39).

1.6.1.1. Os promotores nif

Os promotores ativados pelas proteínas NifA e NtrC não exibem a típica sequência de consenso geralmente encontrada em promotores de enterobacteriáceas: TTGACA..N₁₆₋₁₉..TATAAT, localizado nas proximidades das posições -35 e -10 em relação à origem de transcrição. Por outro lado, sequências

altamente conservadas foram encontradas em promotores ativados pelos produtos dos genes nifA e ntrC: CTGG...N₈...TTGCA nas posições -27 e -16 (13,38,59,199).

Os nucleotídeos GG e GC, localizados nas posições -25/-24 e -13/-12 respectivamente, são características invariáveis destes promotores e aparentemente são essenciais à sua atividade (52,104). Por este motivo estes promotores são chamados também de promotores -24/-12 em contraposição aos promotores canônicos -35/-10 de E. coli (258).

Os promotores -24/-12 são reconhecidos pela RNA polimerase ligada a um fator sigma especial, o fator σ^{54} codificado pelo gene rpoN (ntrA, qinF). O complexo RNA-polimerase/ σ^{54} sempre requer um ativador (por exemplo NifA ou NtrC) para iniciar a transcrição a partir de promotores -12/-24 (52).

O produto do gene rpoN foi inicialmente identificado como um efetor positivo, ao lado de NifA e NtrC, para a expressão de genes nif e ntr (59,176,199). Estes estudos demonstravam que a ativação de transcrição de genes nif em K. pneumoniae e E. coli pelas proteínas NifA e NtrC tinham um requerimento absoluto pelo produto do gene rpoN (176). Por outro lado promotores nif não são ativados em estírpes ntrA⁺nifA⁻ntrC⁻ (176). Em K. pneumoniae o gene rpoN não está ligado a ntrC, é expresso constitutivamente e independe da disponibilidade de nitrogênio (182). A proteína RpoN de K. pneumoniae e E. coli compete com RpoD (fator σ^{70}) pela RNA-polimerase (124,134,182). Estes resultados sugeriram que o gene rpoN codifica para um fator sigma especial da

RNA-polymerase que reconhece especificamente os promotores -24/-12. A sequência de aminoácidos de RpoN de *K. pneumoniae* e de *A. vinelandii*, deduzida da sequência de nucleotídeos, mostra que a proteína RpoN guarda pouca homologia em relação a sequência de aminoácidos de outras subunidades sigma, apesar de possuir 2 estruturas em hélice-volta-hélice, característica de proteínas que se ligam ao DNA (179,180).

É interessante notar que, ao contrário de outras subunidades sigma utilizadas para transcrição de genes específicos, RpoN (σ^{54}) é necessário para a transcrição de genes de diferentes funções fisiológicas. Alguns exemplos destes genes são: a)genes do metabolismo de nitrogênio e aminoácidos; b)genes que codificam para o transporte de ácidos dicarboxílico em *Rhizobium*; c)genes que codificam para enzimas do metabolismo de tolueno e xileno em *Pseudomonas*; d)genes envolvidos no metabolismo anaeróbio em *E. coli* (para revisão ver 160).

A análise de mutações dos promotores -24/-12 demonstra que existe uma estrutura mínima, estritamente conservada, essencial para a atividade deste tipo de promotor. Buck (27) mostrou que a diminuição de um ou mais nucleotídeos entre -24 e -13 desensibiliza o promotor do operon *nifHDK* de *K. pneumoniae* para ativação pelas proteínas NtrC e NifA. Mutações isoladas em cada um destas quatro posições em promotor *nifLA* de *K. pneumoniae* impediram sua ativação por NifA ou NtrC (31,152). No promotor *nifH* de *K. pneumoniae* a transição G→A nas posições -24 e -13 impediu a ativação por NifA ou NtrC (31,200). Entretanto a transição C→T na

posição -12 teve um efeito inesperado quando impediu a ativação por NtrC mas não por NifA (31). A mesma mutação no promotor nifL impede a ativação por NifA e por NtrC (31). Este último resultado sugere que o sítio de ligação para NifA (UAS), presente no promotor nifH, mas ausente no promotor nifL, garanta a ativação por NifA (52,187). Portanto, a substituição de um nucleotídeo em -25/-24 e -13/-12 nos promotores nifL e nifH de *K. pneumoniae* confirma a importância dos nucleotídeos GG e GC naquelas posições (27,31,152,200).

Além disto, transições C→T nas posições -15 a -17 do promotor nifH de *K. pneumoniae*, produzindo um promotor com a sequência CTGGTTATGTTTTGCA, aumentaram o nível de ativação por NtrC (200) e permitiram a ativação por NifA mesmo na ausência de UAS (28). O promotor nifH de *Rhizobium meliloti* (5'-CTGGCACGGACTTTGCA-3') também exibe este fenótipo (28). Aparentemente, aquele promotor nifH mutante de *K. pneumoniae*, assim como o promotor nifH de *R. meliloti*, possuem uma maior afinidade pelo complexo RNAPolimerase- σ ⁵⁴ que o promotor nifH selvagem de *K. pneumoniae*, levando à formação de um complexo fechado mais forte. A ligação das proteínas ativadoras NifA ou NtrC aos respectivos sítios de ligação permitiria um aumento da concentração do ativador na região do promotor e consequentemente aumentaria a sua eficiência (28). Assim, a formação de um complexo fechado estável facilitaria a ativação do promotor pelas proteínas NifA e NtrC não ligadas à UAS (28,187).

A sequência de bases específica de cada promotor

-12/-24, a presença de UAS e sua sequência são fatores que aparentemente permitem um controle fino da expressão gênica.

1.6.1.2. NifA: uma proteína capaz de interagir com DNA

O gene nifA de K. pneumoniae, bem como o de vários outros organismos, foi克lonado e sequenciado. Estudos comparativos das sequências de aminoácidos das proteínas NifA de K. pneumoniae e R. meliloti levou Drummond et al. (60) a definir 4 domínios estruturais: domínios A, C, D e E. Na porção N-terminal estão os domínios A e C. Nestes domínios o grau de homologia decresce consideravelmente quando se aumenta o número de proteínas NifA comparadas (86). As funções específicas destes domínios ainda não foram identificadas, mas Drummond et al. (60) aventaram a hipótese de interação da região N-terminal com uma proteína controladora da atividade da proteína NifA. Em K. pneumoniae esta proteína seria NifL. Um alto grau de homologia tem sido encontrado no domínio D ou domínio central das proteínas NifA de diferentes espécies. Neste domínio encontram-se 2 porções altamente homólogas à sequência de proteínas que ligam ATP (90,192). Drummond et al. (60) sugeriram que a região do domínio D seja importante para a interação com RpoN e/ou RNAPolimerase. Finalmente, o domínio E apresenta uma estrutura αhéliz-volta-αhéliz (H-V-H) altamente conservada, que é característica de proteínas que se ligam diretamente a sequências específicas do DNA (60).

A presença da estrutura H-V-H sugere que a proteína NifA liga-se ao DNA para exercer sua função fisiológica. De

fato, Buck *et al.* (32) observaram que deleções entre -184 e -72 do promotor nifH de K. pneumoniae gradualmente reduziam sua sensibilidade à ativação pela proteína NifA. A análise dessa região mostrou a existência de uma sequência de consenso nos promotores nif de K. pneumoniae, exceto nifLA, de Rhizobium e de Azotobacter: G/A...N₇...TGT...N₄...T...N₅...ACA, presente entre -150 e -100, em relação a origem de transcrição dos genes nif analisados (32). A remoção desta sequência do promotor nifH de K. pneumoniae levou a uma drástica diminuição da ativação pela proteína NifA (<5%). Entretanto, a mesma deleção praticamente não afetou a ativação por NtrC (80%) (32). Além disso, esta sequência pode exercer seu efeito quando localizada até 2 kb acima do início de transcrição, sendo sua atividade máxima para o promotor do gene nifH K. pneumoniae quando localizada na posição -136 (32). Estes resultados levaram à hipótese de que a proteína NifA se ligava especificamente àquela sequência e que foi, portanto, denominada de sítio de ligação para NifA ou UAS ("upstream activating sequence").

A proteína NifA apresenta alta homologia com a proteína NtrC nos domínios D e E, sugerindo que as funções hipotéticas destes domínios, isto é, interação com o aparelho de transcrição e sítio de ligação ao DNA, sejam comuns a ambas proteínas (60).

A análise de mutações introduzidas na UAS mostrou sua importância para a ativação do promotor nifH de K. pneumoniae. Quando a estrutura TGT-ACA sofria as

substituições G→T ou G→A a proteína NifA foi incapaz de ativar o promotor nifH. Modificações nos nucleotídeos que rodeiam este motivo estrutural, bem como alterações no espaçamento entre TGT e ACA levaram a uma redução significativa da ativação do promotor nifH por NifA (30,188). Experimentos de metilação com dimetilsulfato (DMS) "in vivo" mostraram que a proteína NifA protegia a UAS do promotor nifH nas posição -136 da fita codificadora, e nas posições -123, -126 e -127 na fita não codificadora (186), indicando claramente que a proteína NifA interage intimamente com a UAS. A proteção destas bases por NifA independe da presença de RpoN (186).

Outros estudos mostraram que a porção C-terminal da proteína NifA isoladamente é capaz de proteger a UAS, produzindo o mesmo padrão de metilação que a proteína NifA completa (188). Cinco mutantes da proteína NifA, cuja estrutura H-V-H tem um aminoácido substituído, foram incapazes de ativar a transcrição do promotor nifH e de proteger a UAS da metilação por DMS (188). Da mesma forma proteínas NtrC mutantes que sofreram substituições no sítio de ligação de DNA, capazes de distorcerem a estrutura H-V-H, são ineficientes na ativação do promotor nifL de *K. pneumoniae* (43). Estes dados apoiam a hipótese inicial de que a estrutura H-V-H seja efetivamente o sítio de ligação de DNA da proteína NifA e da proteína NtrC (60).

A constatação de que a proteína NifA liga-se especificamente a uma sequência de DNA localizada acima do promotor -12/-24, aliada a necessidade do posicionamento da

UAS à face correta do DNA (29), levou os autores a sugerirem que a ativação do promotor ocorre via a formação de uma alça, facilitando o contato entre a proteína ativadora e o complexo RNA-polymerase/ α^{54} (29).

1.6.1.3. O papel do sistema ntr

A proteína NtrC também interage com uma sequência específica de nucleotídeos, GCACY-N₅-TGGCA, e que está localizada, a exemplo da UAS, cerca 100 acima ao promotor -24/-12 (52). A interação da proteína NtrC com esta sequência permite a ativação dos promotores -24/-12 (52,227). Entretanto, promotores -24/-12 de alta afinidade pelo complexo RNA-polymerase/ α^{54} , como o promotor nifH de *R. meliloti*, são ativados pela proteína NtrC na ausência de sítios de ligação (42,200,28).

A síntese e a atividade da proteína NtrC é regulada por um mecanismo complexo. O gene ntrC faz parte do operon qinAntrBC de *K. pneumoniae* que está sujeito a um intrincado autocontrole transicional. Três promotores foram identificados nesse operon em *K. pneumoniae* (51): a) um promotor canônico -35/-10 de Enterobacteriaceae localizado acima do gene qinA, reprimível por NtrC; b) um promotor -24/-12 ativado por NtrC, localizado entre o gene qinA e o primeiro promotor; e c) um promotor canônico acima do gene ntrB, também reprimível por NtrC.

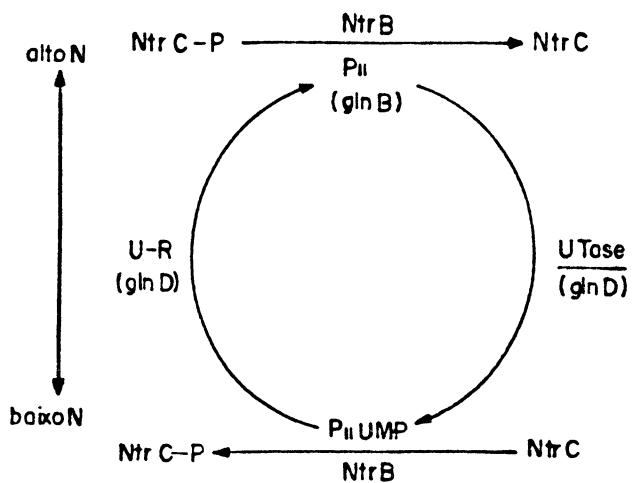
A regulação da atividade da proteína NtrC segue um modelo tipo cascata (177) (figura 3). Em condições limitantes de nitrogênio (NH_4^+) o produto do gene qinD, uma

uridililtransferase, uridilila a proteína P_{II} , produto do gene ginB (34). A relação α -cetoglutarato/ glutamina é o provável sinal modulador da atividade da uridililtransferase (34). Uma alta razão α -cetoglutarato/glutamina ativa a uridililtransferase. A proteína P_{II} uridililada interage com a proteína NtrB que, por sua vez, fosforila a proteína NtrC (34,114,147,195,226,227). A proteína NtrC fosforilada (NtrC-P) tem alta afinidade pelo seu sítio de ligação no DNA, ativando assim os promotores -24/-12 dependentes de NtrC, como o do nifLA (6,114,195). A proteína NtrC-P também inibe a transcrição a partir dos promotores canônicos de ginA e ntrB (6,51,114).

Em condições de excesso de nitrogênio (NH_4^+) a uridililtransferase remove o grupo uridilil da proteína P_{II} que, nesta forma, permite que a proteína NtrB defosfore a NtrC, evitando a ativação de transcrição dos promotores NtrC dependentes. A repressão da transcrição do operon nifLA mediada pelo sistema NtrC/NtrB ocorre em níveis de NH_4^+ de cerca de 10 mM (39). Porém a repressão da fixação de nitrogênio ocorre em níveis de NH_4^+ menores que este e é assegurada graças a um segundo mecanismo de controle via NifL, específico para os genes nif (figura 2).

O promotor nifLA de *K. pneumoniae* possui duas sequências homólogas à sequência consenso do sítio de ligação para NtrC (6,59). Apesar destas sequências, localizadas a -163 (sítio 1) e a -142 (sítio 2) em relação ao início de transcrição, serem de baixa afinidade, Austin *et al.* (6) demonstraram que a proteína NtrC-P efetivamente

FIGURA 3 - MODELO PARA A REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NTRC EM RESPOSTA AO "STATUS" DE NITROGÊNIO



Uridililtransferase (produto do gene glnD) catalisa a uridiliação (UTase) e deuridiliação (U-R) da proteína P_{ii} (produto do gene glnB). A proteína NtrB catalisa a fosforilação e defosforilação da proteína NtrC (177).

se liga a ambos os sítios. Mutações nas posições -169 (C→T) e -148 (C→T) ou em ambas as posições diminui a afinidade por NtrC-P. Além disso a afinidade do sítio 1 era também diminuída quando apenas o sítio 2 estava mutado, e vice-versa, indicando que NtrC se liga aos dois sítios cooperativamente (6,43). Evidências indicam ainda que a ativação do operon nifLA por NtrC também depende da face do DNA com a qual interage e envolve a formação de um alça no DNA permitindo NtrC interagir intimamente com RNA-polimerase e/ou RpoN (185).

1.6.1.4. Mecanismo de ativação dos promotores -24/-12

Experimentos de proteção de metilação por DMS e proteção de digestão por DNase I mostraram que RpoN, RNA polimerase e promotor -24/-12 são capazes de interagir formando um complexo fechado (187,218). Esta interação depende da afinidade do promotor pelo complexo RNAPolimerase- σ^{54} . Aparentemente em promotores de baixa afinidade por RNAPolimerase-RpoN as proteínas NifA ou NtrC participam na estabilização do complexo fechado (187).

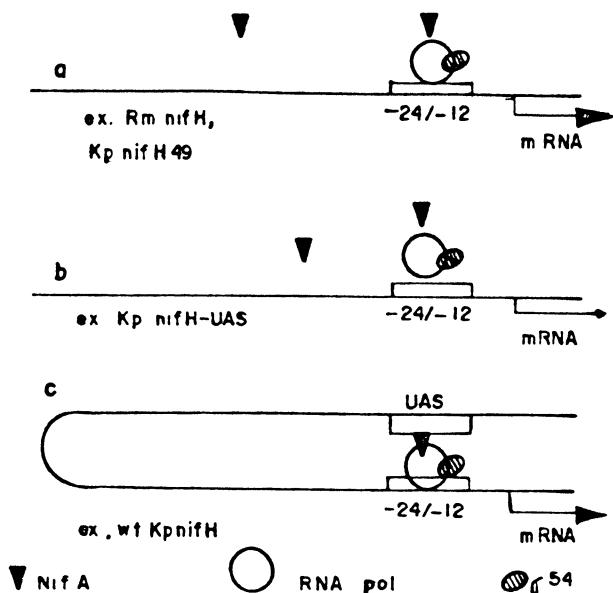
Experimentos de proteção contra metilação por DMS ("footprint" com DMS) do promotor -24/-12 do gene glnA de Salmonella typhimurium mostraram que a proteína RpoN protege os resíduos de guanina -13, -24 e -25 da fita codificadora e os resíduos -12, -14, -21 e -23 da fita não codificadora (218). No promotor nifH de K. pneumoniae os resíduos guanina -13, -24 e -25 também foram protegidos pela proteína RpoN,

enquanto que no mesmo promotor de *R. meliloti* foram protegidos os resíduos -14, -25 e -26 da fita codificadora e os resíduos -11, -13, -22 e -24 da fita não codificadora. Convém lembrar que no promotor de *R. meliloti* os resíduos GG e GC correspondem às posições -26/-25 e -14/-13 respectivamente (187). Estes resultados indicam que a interação da RNAPolimerase- σ^{54} com esses promotores -24/-12 é semelhante. Por outro lado, as proteínas NtrC e NifA também são capazes de se ligar aos seus respectivos sítios na ausência de RpoN (6,186).

A formação de complexo aberto, que permite o início de transcrição, só acontece na presença de uma proteína ativadora (NifA ou NtrC), das proteínas RNA polymerase e RpoN e do promotor -24/-12 (52). Popham *et al.*, (218) mostraram que a presença de ATP era necessária para o início de transcrição do promotor sinA, na presença de NtrC. Provavelmente ATP se liga ao domínio central (domínio D) e é hidrolizado durante a catálise da transformação do complexo fechado em complexo aberto. Possivelmente a proteína NifA também requeira ATP. Esta conclusão vem do fato de que os domínios D de ambas proteínas NifA e NtrC apresentam duas sequências de aminoácidos altamente conservadas, características de proteínas que ligam nucleotídeos (90,192).

A função do sítio de ligação no DNA para proteínas ativadoras (NifA ou NtrC) é provavelmente a de aumentar a concentração do ativador nas vizinhanças do complexo RNAPolimerase- σ^{54} /promotor -24/-12, possivelmente via

FIGURA 4 - MODELO DE ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE PROMOTOR
-24/-12 POR NIFA



a) A formação de um complexo fechado forte permite que o ativador (a proteína Nifa) interaja produtivamente com a RNAPolimerase- σ^{54} in "trans" (sem estar ligada a UAS), ativando a transcrição. b) Na ausência um complexo fechado forte, a interação da RNAPolimerase- σ^{54} com Nifa não ligado a UAS, não é produtiva. c) A ligação de Nifa a UAS força a proteína ativadora a ficar na vizinhança do início de transcrição e favorece a interação com a RNAPolimerase- σ^{54} . Esta interação poderia estabilizar o complexo fechado antes da formação do complexo aberto. Por outro lado, a fraca interação RNAPolimerase- σ^{54} /promotor -24/-12 pode ser produtiva em virtude da alta concentração local da proteína Nifa. Este modelo foi construído segundo Morrett e Buck (187).

formação de uma alça de DNA (6,29,185,187). Em promotores -24/-12 de alta afinidade pela RNAPolimerase- σ^{54} , onde ocorre a formação de um complexo fechado estável, a proteína ativadora não ligada a UAS é capaz de ativar o início de transcrição. Este fato tem sido observado com o promotor nifH de R. meliloti e com o promotor nifH mutantes de K. pneumoniae (28). Em promotores de baixa afinidade, ao contrário, a proteína ativadora não pode prescindir de um sítio de ligação e pode ter um papel importante na estabilização do complexo fechado (187).

Em resumo, o modelo mais aceito e que engloba as implicações dos resultados disponíveis, envolve inicialmente a formação de um complexo fechado do qual tomam parte a RNAPolimerase- σ^{54} e o promotor -24/-12 (figura 4). A isomerização do complexo fechado a aberto é catalisado pela proteína ativadora (NifA ou NtrC), provavelmente utilizando ATP como fonte de energia. A interação entre a proteína ativadora e o complexo fechado (RNAPolimerase- σ^{54} /promotor -24/-12) é facilitada pela ligação da primeira ao seu sítio de ligação (UAS), e provavelmente seguido do dobramento do DNA, o que permitiria a aproximação da proteína ativadora do complexo fechado. É interessante notar que o aumento de 5 nucleotídeos na região entre o promotor nifH de K. pneumoniae e sua UAS leva a inibição da ativação por NifA, mas o aumento de 10 nucleotídeos produz um fenótipo normal, indicando que a função da proteína NifA depende da face do DNA com a qual interage (29). Resultados recentes indicam que a ativação do promotor nifLA de K. pneumoniae pela

proteína NtrC depende também da face do DNA com a qual interage (185).

1.6.1.5. Repressão da fixação de nitrogênio: o papel da proteína NifL

O produto do gene nifL atua como repressor específico da expressão dos genes nif em K. pneumoniae. Em condições de excesso de nitrogênio fixado ($\approx 4\text{mM}$) e/ou altos níveis de oxigênio ($\geq 6\mu\text{M}$) a proteína NifL inibe a expressão dos genes nif, exceto do operon nifLA (39,53,85,123,181). A inibição da expressão de genes nif em altas concentrações de oxigênio não está relacionada com o produto do gene fnr que é necessário para regulação transcricional de genes de redutase anaeróbicas (120).

A sequência de aminoácidos da proteína NifL de K. pneumoniae, deduzida a partir da sequência de DNA, exibe na sua região C-terminal uma homologia limitada com a proteína NtrB (61). As proteínas NtrB e NtrC fazem parte de uma família de proteínas reguladoras capazes de reagir a estímulos ambientais. Os componentes desta família de proteínas agem sempre aos pares, onde um componente "sente" o estímulo (NtrB) e o transmite ao outro componente (NtrC) que reage a nível de controle de expressão gênica (2). Além do par NtrB/NtrC, também fazem parte deste grupo os pares DctA/DctD, reguladores do sistema de transporte de ácidos dicarboxílicos, e FixL/FixJ, reguladores da transcrição do gene nifA em R. meliloti. Apesar desta similaridade na porção C-terminal, a maior porção da proteína NifL não

apresenta homologia com a proteína NtrB (61). Nenhum provável sítio de ligação para DNA foi encontrado na sua sequência (61), indicando que sua função repressora provavelmente ocorra via uma inativação da proteína NifA, como já tinha sido sugerido anteriormente (25). Uma característica interessante da proteína NifL é a presença de um possível sítio redox (cys-x₂-cys-gly), estritamente semelhante àquele de uma variedade de proteínas envolvidas em processos de óxido redução. Drummond e Wootten (61) aventaram a hipótese de que esta estrutura pudesse ser um possível sítio de ligação de um grupo heme que agiria no sensoriamento dos níveis de oxigênio. Posteriormente esta hipótese foi abandonada pois mutantes de *E. coli* deficientes na produção de heme apresentavam regulação da fixação de nitrogênio pelo oxigênio semelhante ao tipo selvagem (249). O agrupamento cys-x₂-cys-gly pode, entretanto, estar diretamente relacionado ao sensoriamento de oxigênio por NifL (61).

A atividade da proteína NifA, ao contrário do que acontece com o par NtrC/NtrB, não depende da proteína NifL. Por outro lado NifL aparentemente inativa NifA na presença de excesso de NH₄⁺ ou oxigênio (5,25), agindo como um anti-ativador. Estudos de estabilidade de mRNA indicaram ainda que a presença do produto do gene nifL desestabiliza os transcritos nif em altas concentrações de amônia e/ou oxigênio (45).

Cannon et al. (39) determinando a velocidade de transcrição dos genes nif e de síntese dos polipeptídeos Nif

observaram que após a adição de amônio (10 mM de NH_4Cl) ocorria uma queda imediata da síntese de RNA e de polipeptídeos nif inclusive daqueles do operon nifLA. Isto foi interpretado como uma ação repressora de NH_4^+ via as proteínas reguladoras NtrB/NtrC e NifL/NifA. Entretanto a adição de oxigênio (6 ou 60 μM) a uma cultura despreprimida de *K. pneumoniae* não alterou a velocidade de transcrição do operon nifLA, enquanto ocorria queda na de outros operons nif. Estes resultados são conflitantes com dados de outros autores, porque Dixon *et al.* (53) e Kong *et al.* (157) reportaram inibição da transcrição do operon nifLA em concentrações mais altas de oxigênio. Posteriormente Dixon *et al.* (54) determinaram que a expressão do operon nifLA de *K. pneumoniae* era sensivelmente reduzida quando as células são crescidas em aerobiose. O mesmo nível de inibição ocorre também em anaerobiose e na presença de um inibidor da DNA girase. Entretanto os efeitos repressivos do O_2 e do inibidor de DNA girase não são cumulativos o que levou os autores a sugerirem que estes efeitos atuariam sobre o mesmo sítio. Anteriormente já tinha sido observado que durante o crescimento aeróbico de *S. typhimurium* ocorria um alto nível de atividade de topoisomerase I e consequente relaxamento do cromosoma, enquanto que durante o crescimento anaeróbico predominava uma alta atividade de DNA girase (56,265). Desta forma o grau de superenrolamento do DNA aparentemente influencia a expressão de genes nif, provendo um segundo tipo de controle da expressão da fixação de nitrogênio por oxigênio (54).

1.6.2. Regulação da fixação de nitrogênio em Rhizobium e Bradyrhizobium

Em Rhizobium e Bradyrhizobium a ativação de genes nif e de alguns dos genes fix é também dependente de RpoN e ativada por NifA (104). Essa conclusão vem do fato das sequências dos genes nif e fix apresentarem promotores do tipo -24/-12 e UAS, confirmada por estudos de fusão lacZ com genes nif destes organismos. Os genes nifA de R. meliloti (36), R. leguminosarum bv. viciae (102), Bradyrhizobium japonicum (258) e Azorhizobium caulinodans (192) foram克lonados e sequenciados. As sequências de aminoácidos destes genes nifA são altamente homólogas àquela do gene de K. pneumoniae nos domínios D e E, indicando funções semelhantes. Uma característica que distingue as proteínas NifA é a presença de um interdomínio (86) ligando os domínios D e E dos diazotrofos simbióticos acima, mas ausente na proteína NifA de K. pneumoniae (36,60) e de A. vinelandii (12). Este interdomínio parece estar relacionado com a sensibilidade da proteína NifA de R. meliloti e B. japonicum ao oxigênio (86).

Em R. meliloti o gene ntrC não é importante para a fixação simbiótica de nitrogênio, uma vez que mutantes ntrC::Tn5 produzem nódulos eficientes em alfafa (257). Apesar disso baixos níveis de ativação do promotor nifH e fixA de R. meliloti por NtrC pode ser detectada (257). A estrutura do operon pfixABCXpnifA de R. meliloti é única e aparentemente representa um ponto chave no controle da

fixação de nitrogênio deste organismo (36,88). O promotor de fixA é do tipo -24/-12 e possui uma UAS sendo, portanto, ativado por NifA (36). Cerca de 70% dos transcritos deste promotor correspondem também ao gene nifA (154). O promotor do gene nifA, que não é do tipo -24/-12, não é autoativável. Evidências recentes indicam que o promotor nifA é regulado por um par de proteínas reguladoras: FixL e FixJ, que respondem à concentração de oxigênio (47,153). Em baixos níveis de oxigênio FixL sinaliza para que FixJ ative a transcrição do promotor nifA. A proteína NifA por sua vez ativa a transcrição dos outros genes nif e fix, inclusive fixABCXnifA. FixJ ativa ainda a transcrição da região fixN, cuja função é desconhecida. Sob condições de altas concentrações de oxigênio a proteína FixJ não ativa a transcrição do promotor nifA.

Existe ainda um outro gene regulador em R. meliloti, fixK, cujo produto, FixK, é homólogo à proteína Fnr que age na regulação do metabolismo anaeróbico em E. coli (11). A proteína FixK aparentemente atua como repressor da expressão de promotor nifA e também do promotor fixK, mas é ativador da transcrição de fixN (11). Como a expressão de fixK é dependente de FixJ, a ativação da expressão da região fixN por FixJ possivelmente ocorre via FixK (11).

Em R. japonicum os níveis de oxigênio não parecem afetar a ativação da expressão do gene nifA. Inicialmente, o promotor -24/-12 do operon fixRnifA é ativado positivamente por uma proteína ainda não identificada e capaz de se ligar a uma hipotética sequência ativadora (259). O produto do

gene nifA, por sua vez, ativa a transcrição de outros operons nif e fix, inclusive fixRnifA, desde que em condições de microaerofilia ou anaerobiose (87,259).

1.6.3. Regulação da fixação de nitrogênio em Azotobacter

Em A. vinelandii e A. chroococcum a expressão dos genes nif é ativada pela proteína NifA e requer o fator sigma RpoN (178,150). O gene rpoN de A. vinelandii e o gene nifA de A. vinelandii e A. chroococcum foram clonados e sequenciados (12,74,150,180,240) e possuem funções semelhantes àqueles de K. pneumonia. Entretanto, a transcrição do gene nifA parece não ser ativado por NtrC em Azotobacter vinelandii (8). Por outro lado, Ball *et al.* (8) demonstraram que a expressão V-nitrogenase depende da presença do gene ntrQ. Um novo gene regulador (nfrX) foi identificado por Santero *et al.* (240) em Azotobacter vinelandii. Mutantes neste gene são Nif⁻ para a nitrogenase convencional e para a Fe nitrogenase, mas não para a V nitrogenase, e podem ser complementados para a Mo nitrogenase pelo gene nifA de K. pneumoniae expresso constitutivamente (8,240). Aparentemente a idéia inicial de que o produto de nfrX ativaría a transcrição do gene nifA não é verdadeira (Kennedy, comunicação pessoal) e a função do produto deste gene permanece desconhecida.

Ainda não existe evidência precisa para a presença de gene homólogo a nifL em Azotobacter ou em qualquer outro diazotrofo a não ser em Enterobacteriaceae diazotrófica (121). Entretanto Bennet *et al.* (12) relatam a presença de uma ORF de A. vinelandii precedendo o gene nifA e

aparentemente co-transcrita com nifA. Esta ORF apresenta sequências com homologia limitada ao produto do gene nifL de K. pneumoniae (9,12). Mutações nesta ORF produzem mutantes de A. vinelandii insensíveis a amônia e molibdênio, sugerindo que o produto deste gene atue no mecanismo de repressão da expressão dos genes nif (9). Segundo estes mesmos autores a expressão do gene nifA não depende de RpoN.

As regiões promotoras dos genes que codificam para a V-nitrogenase de A. vinelandii e A. chroococcum e da Fe-nitrogenase de A. vinelandii apresentam sequência consenso -24/-12 mas não apresentam UAS (143,235,237). Recentemente foram clonados e sequenciados dois genes nifA-like, ynfA e anfA, que aparentemente estão relacionados com a ativação da expressão da nitrogenase 2 e da nitrogenase 3, respectivamente (142). Promotores do tipo -24/-12 foram identificados nestes genes.

Existe ainda um outro controle sobre a expressão das nitrogenases em A. vinelandii, paralelo ao controle por nitrogênio fixado: a regulação pela disponibilidade de molibdênio (139,207,220). Na presença de molibdênio somente a nitrogenase convencional é expressa. Por outro lado, em meio contendo vanádio mas deficiente em molibdênio ocorre a expressão da nitrogenase 2. A nitrogenase 3 somente é expressa em condições limitantes de molibdênio e vanádio (207). Recentemente foi sugerido que a regulação por molibdênio poderia ser mediada pelo produto do gene homólogo ao gene nifL de K. pneumoniae (9).

1.6.4. Regulação da fixação de nitrogênio em Azospirillum

Mutantes Nif⁻ regulatórios e estruturais de A. brasiliense foram isolados (96,140,214,215). Duas classes de mutantes regulatórios foram descritos (214,215): uma constituída pelos mutantes FP8 e FP9, que apresentavam fenótipos Nif⁻, não crescam em nitrato como fonte de nitrogênio e tinham o fenótipo Nif⁺ restaurados pelos plasmídeos pCK3 (nifA^C) e pGE10 (glnAntrBC de K. pneumoniae), mas não eram complementados pelo plasmídeo pGE50 (pGE10ntrC::Tn5). Estes mutantes foram caracterizados como ntrC⁻. A outra classe era constituída pelo mutante FP10. O mutante FP10 possui fenótipo Nif⁻ e é complementado apenas pelo plasmídeo pCK3, sendo portanto considerado um mutante nifA⁻. Estes resultados sugerem que os genes nif de A. brasiliense são regulados por um sistema semelhante ao de K. pneumoniae. Posteriormente, Funayama *et al.* (94) isolaram 3 outros mutantes de A. brasiliense Sp 245 que foram inicialmente caracterizado como nifA⁻.

Fogher *et al.* (88) construíram um banco de genes de A. brasiliense SP7 no cosmídeo pVK100 e identificaram um plasmídeo (pAB441), com inserto de 20 kb, capaz de complementar A. brasiliense 7029, mutante auxotrofo para a glutamina (96), mas incapaz de complementar os mutantes FP8 e FP9. O plasmídeo pAB441 hidridiza com o gene glnA de K. pneumoniae, mas não com o gene ntrC (20). O sequenciamento do gene glnA de A. brasiliense não mostrou qualquer homologia com a sequência de consenso dos promotores -24/-12, nem com a do promotor canônico de E. coli (19). Recentemente, o

sequenciamento do gene nifH de A. brasiliense mostrou que a proteína deduzida possuía uma alta homologia com a dinitrogenase redutase de outros organismos (78,205,267). A análise da região promotora do gene nifH mostrou ainda a presença de promotor do tipo -24/-12 e sítio de ligação para NifA (78,267), confirmando que a regulação da fixação de nitrogênio em A. brasiliense envolve o produto do gene nifA, como sugerido previamente por Pedrosa e Yates (214,215).

1.7. H. seropedicae: UM NOVO MODELO PARA O ESTUDO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio encontrada na rizosfera ou associada à raízes de gramíneas (7). Apresenta-se como um diazotrofo Gram negativo, geralmente vibróide, móvel e crescendo com formação de película em meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado. H. seropedicae apresenta DNA com um conteúdo (G + C) de 87% (7), um pouco inferior ao de Azospirillum spp. A atividade de nitrogenase de H. seropedicae é mais tolerante a extremos de pH e a maiores concentrações do oxigênio que a de Azospirillum spp (7).

Herbaspirillum seropedicae foi inicialmente classificado no gênero Azospirillum baseado em seu conteúdo (G + C) (7). Entretanto resultados recentes de hibridização DNA/RNA mostraram uma baixa homologia entre H. seropedicae e três espécies de Azospirillum (<20%) (76). Estes resultados

indicaram ainda que H. seropedicae é muito mais próximo de Rhodospirillum tenue (47% de homologia de RNA). A taxonomia de H. seropedicae continua a despertar interesse pois recentemente se descobriu que cepas de Pseudomonas pseudorubro albicans apresentam alta homologia DNA/RNA com H. seropedicae (J. Dobereiner, com. pessoal).

Quando iniciamos este trabalho nada era conhecido a respeito da genética da fixação de nitrogênio em H. seropedicae. Considerando sua importância potencial para a agricultura como biofertilizante, iniciamos este projeto com o objetivo de determinar a organização estrutural e a regulação dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio em H. seropedicae.

No presente trabalho o gene nifA e parte do gene nifB foram clonados, caracterizados e sequenciados. Além disto, é discutida a função fisiológica do gene nifA e proposto um modelo para a regulação da fixação de nitrogênio em H. seropedicae.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. BACTÉRIAS, PLASMÍDEOS E BACTERIÓFAGOS

As estirpes de bactérias, plasmídeos e bacteriófagos utilizados neste trabalho estão listadas na tabela 1.

2.2. REAGENTES

Canamicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, estreptomicina, DNA λ digerido com Hind III, MOPS, Tris base, ATP, hidroxiquinoleína, SDS, agarose, TEMED, acrilamida, cloranfenicol, lisozima, espermidina, o-nitrofenol-β-D-galactosídeo, bisacrilamida, persulfato de amônio, albumina bovina, Ficoll, DNA de esperma de salmão, polivinilpirrolidona, formamida, e ditiotreitol (DTT) foram adquiridos de Sigma Chemical Company. Os desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2,3-didesoxinucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP), 7-deaza-desoxiguanosina (7-deaza-dGTP) e hexadesoxinucleotídeos foram adquiridos de Pharmacia. EDTA foi adquirido de Sigma ou BDH (British Drug House). Carbenicilina foi adquirida de Boheringer. Fenol foi adquirido de E. Merck ou BDH. Padrão de peso molecular 1 kb Ladder e uréia foram adquiridos de BRL (Bethesda Research Laboratories). Os demais reagentes utilizados foram pró-análise e da mais alta qualidade disponível.

Todas as soluções e soluções tampão foram preparadas

TABELA 1 - Estírpes de bactérias, plasmídeos e bacteriófagos utilizados

Estírpes	genótipo/fenótipo relevante	referência ou fonte
Bactérias		
<i>H. seropedicae</i>		
Z78	Nif ⁺ , w.t.	7
<i>A. brasiliense</i>		
FP2	Nif ⁺ Nal ^R Sm ^R	214,215
FP3	<u>nifHDK</u> ⁻ Nal ^R Sm ^R	214,215
FP6	Nif ⁻ Nal ^R Sm ^R (MoFe ⁻)	214,215
FP8	<u>ntrC</u> ⁻ Nal ^R Sm ^R	214,215
FP9	<u>ntrC</u> ⁻ Nal ^R Sm ^R	214,215
FP10	<u>ntrC</u> ⁻ Nal ^R Sm ^R	214,215
<i>E. coli</i>		
HB101	<u>hsds20</u> <u>recA</u> Sm ^R <u>supE</u> λ ⁻	172
DH5	<u>endA</u> <u>recA</u> Nal ^R	C. Gancedo
S17.1	RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7 ⁺ Tra ⁺ <u>recA</u>	246
71-18	Δ(<u>lac-pro</u>) F' <u>lacI</u> ^q <u>Z</u> M15 <u>pro</u> ⁺	C. Kennedy
C600	<u>supE</u> λ ⁻	172
C600	<u>supE</u> , λ _c ts857 Sam7	C. Roessner
ET8000	<u>lacZ</u> ::IS1 Nal ^R	C. Kennedy
ET8045	<u>lacZ</u> ::IS1 Nal ^R <u>ntrA</u> ::Tn10	C. Kennedy
ET8556	<u>lacZ</u> ::IS1 Nal ^R <u>ntrC</u>	C. Kennedy

Tabela 1 - cont.

BHB2688	(N205 <u>recA</u> ⁻ <u>γ</u> <u>imm</u> ⁴³⁴ , <u>cits</u> , <u>b2</u> , <u>red</u> ⁻ , <u>Dam</u> , <u>Sam/γ</u>)	127
BHB2690	(N205 <u>recA</u> ⁻ <u>γ</u> <u>imm</u> ⁴³⁴ , <u>cits</u> , <u>b2</u> , <u>red</u> ⁻ , <u>Dam</u> , <u>Sam/γ</u>)	127
Plasmídeos		
R68.45	<u>Cb</u> ^R <u>Tc</u> ^R <u>Km</u> ^R Inc.P1	109
pVK102	<u>λcos</u> <u>Km</u> ^R <u>Tc</u> ^R Inc.P1	156
pRK2013	<u>Km</u> ^R <u>Tra</u> ⁺ <u>ColE1</u>	82
pBR322	<u>Cb</u> ^R <u>Tc</u> ^R	172
pSUP202	<u>Cb</u> ^R <u>Tc</u> ^R <u>Cm</u> ^R <u>Mob</u> ⁺	248
pTZ18R	<u>Cb</u> ^R <u>lacZ</u> <u>f1</u> <u>IG</u>	175
pTZ19R	<u>Cb</u> ^R <u>lacZ</u> <u>f1</u> <u>IG</u>	175
pMC71A	<u>KpnifA</u> ^C <u>Cm</u> ^R	26
pMM14	<u>KpntrG</u> ^C <u>Cm</u> ^R <u>Tn5</u>	176
pCQ12	<u>RpnifHDK</u> <u>Cb</u> ^R	221
Bacteriófagos		
L47.1	(<u>sr1λ-2</u>), <u>γ</u> <u>imm</u> ⁴³⁴ , <u>NIN 5</u> , <u>chi A131</u>	172
M13K07	<u>Km</u> ^R , "helper phage"	C. Kennedy

com água bdestilada. Quando possível, as soluções eram esterizadas por autoclavação (1 atmosfera, 20 minutos).

O tampão $T_{10}E_1$ continha 10 mM de Tris.HCl pH 8,0 e 1mM de EDTA.

Os gases argônio, nitrogênio super seco, hidrogênio, acetileno, ar comprimido, etileno padrão (100 ppm) foram adquiridos de S.A. White Martins.

O nucleotídeo marcado com fósforo radioativo $[\alpha-^{32}P]dATP$ foi gentilmente cedido pelo Dr. J.C.C. Maia (Instituto de Química, USP). Os nucleotídeos marcado com fósforo radioativo $[\alpha-^{32}P]dCTP$ (>3000 Ci/mmol) e com enxofre radioativo $[\alpha-^{35}S]dATP$ (>600 Ci/mmol) foram adquiridos de Amersham International.

As enzimas de restrição foram adquiridas de Pharmacia, Boheringer, Biolabs ou BRL. Algumas unidades da enzima Xba I foram gentilmente cedidas pelo Dr. F. G. Nóbrega (Instituto de Química, USP). A solução estoque (10 mg/ml) de RNase (Sigma) foi preparada em tampão Tris.HCl 10 mM pH 7,5 contendo 15 mM de NaCl, fervida durante 10 minutos para inativação de DNases contaminantes. A solução estoque (20 mg/ml) de pronase (Sigma) foi preparada em água bdestilada e auto-digerida durante 2 horas a 37°C. A solução estoque (1 mg/ml) de DNAse I (Sigma) foi preparada em solução de NaCl 0,15 M contendo 50% de glicerol. A enzima DNA polimerase I foi gentilmente cedida pelo Dr. A. Zaha (Centro de Biotecnologia, UFRS) e pela Dra. Maria J. A. M. Sampalo (Cenargem). DNA polimerase I fragmento Klenow (fragmento maior) foi adquirida de Amersham International ou de

Pharmacia. A enzima T4-DNA ligase também nos foi gentilmente cedida pelo Dr. A. Zaha (Centro de Biotecnologia, UFRS) ou adquirida de Boheringer ou BRL. Todas estas enzimas foram estocadas a -20°C.

As demais soluções e soluções tampão utilizadas serão descritas oportunamente.

2.3. MEIOS DE CULTURA E ANTIBIÓTICOS

Herbaspirillum seropedicae e Azospirillum brasiliense foram cultivados em meio NFbHP (215) em atmosfera de nitrogênio contendo 0,5-1,0% de oxigênio ou em meio NFbHP suplementado com 20 mM de NH₄Cl (NFbHPN) ou 5 mM de glutamato monossódico (NFbHPglu) sob ar atmosférico. A composição do meio NFbHP é a seguinte:

	gramas/litro
KH ₂ PO ₄	4
K ₂ HPO ₄	6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,02
Ácido nitrilo triacético	0,056
FeSO ₄ ·7H ₂ O,	0,02
Lactato de sódio	5

As vitaminas e os oligoelementos componentes do meio NFbHP foram adicionados antes da esterilização nas seguintes concentrações:

milligrama/litro

Biotina	0,1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
MnSO_4	2,35
H_3BO_3	2,8
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,24

Os fosfatos foram autoclavados separadamente e o pH do meio completo era de 6,8. Os meios NFbHP sólido e semi-sólido tinham a mesma composição mas acrescido de 1,5% e 0,15% de ágar, respectivamente.

As estirpes de Escherichia coli foram cultivadas em meio LB (172) ou 2XTY (10). O meio LB tem a seguinte composição:

gramas/litro

Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10

O pH foi corrigido para 7,0 com NaOH 1 N. O meio sólido (LA) era o meio LB adicionado de 1,5% de ágar. O meio 2XTY continha:

gramas/litro

Triptona	10
Extrato de levedura	10
NaCl	5

O meio mínimo (37) utilizado era suplementado com 20 mM de NH_4Cl ou 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de serina como fonte de nitrogênio e continha:

gramas/litro

MgSO ₄	0,1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,025
K ₂ HPO ₄	12,06
KH ₂ PO ₄	3,4
glucose	20,0

A mistura de fosfato e a solução estoque de glucose (20%) foram preparadas e esterilizadas por autoclavação separadamente. O pH do meio foi 7,4. Esterilização por autoclavação foi feita a 1 atmosfera (120⁰C) durante 20 minutos.

Os antibióticos foram usados nas seguintes concentrações: tetraciclina (Tc) 10 µg/ml; canamicina (Km) 50 µg/ml; estreptomicina (Sm) 50 µg/ml para *E. coli* e 200 µg/ml para *A. brasiliense*; cloranfenicol (Cm) 30 µg/ml; Carbenicilina (Cb) 100 µg/ml; ácido nalidíxico (Nal) 10 µg/ml. As soluções estoques de canamicina (20 mg/ml), estreptomicina (20 mg/ml), ampicilina (100 mg/ml) e ácido nalidíxico (10 mg/ml) foram preparadas em água destilada, esterilizadas por filtração (filtro Millipore 0,45 µ) e estocadas a -20⁰C. As soluções estoques de tetraciclina (10 mg/ml) e cloranfenicol (30 mg/ml) foram preparadas em álcool 95% e mantidas a -20⁰C.

As bactérias foram estocadas em meio sólido inclinado LA ou NFbHPN a temperatura ambiente ou em suspensão contendo 50% de glicerol a -20⁰C.

2.4. TRATAMENTO DAS MEMBRANAS DE DIÁLISE

Membranas de diálise (Sigma) foram fervidas em solução de bicarbonato de sódio 2% durante 10 minutos, lavadas com água bidestilada e novamente fervidas em solução de EDTA 1 mM (172). Em todas as diálices feitas, as membranas foram tratadas desta forma.

2.5. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FENOL E FENOL-CLOROFÓRMIO

O fenol foi equilibrado com tampão Tris.HCl por um procedimento modificado daquele descrito por Maniatis *et al.* (172). Fenol cristalino (Merck) foi fundido a 65°C, acrescido de hidroxiquinolofina (0,1%) e 1 volume de Tris base 0,5 M. A fase aquosa foi removida após decantação e a fase fenólica foi extraída com tampão Tris.HCl 0,1M pH 8,0 contendo 0,2% de β -mercaptoetanol até que o pH da fase aquosa fosse igual ou superior a 7,5. A solução de fenol-clorofórmio foi preparada adicionando uma parte de fenol tamponado a 1 parte de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).

2.6. DEIONIZAÇÃO DA FORMAMIDA

Formamida foi desionizada com resina de troca iônica Amberlite MB1 (10). Aproximadamente 100 ml de formamida foram adicionados a 5 g da resina MB1 em um frasco erlenmeyer, agitados durante 30 minutos à temperatura ambiente e, finalmente, filtrados por papel de filtro qualitativo. Alíquotas de 10-20 ml de formamida foram então estocadas a -20⁰C.

2.7. DOSAGEM DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO MOLECULAR

As concentrações de oxigênio e nitrogênio em fase gasosa foram determinadas em cromatógrafo Varian utilizando uma coluna MS 5A (50⁰C) e argônio como gás de arraste (25 ml/min). Os gases eluídos foram detetados por um detector de condutividade térmica (60⁰C). O ar atmosférico (20,9% de O₂ e 79,1% de N₂, v/v) foi utilizado como padrão.

2.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE

A atividade de nitrogenase foi determinada pela redução de acetileno, essencialmente como descrita por Pedrosa e Yates (214,215).

2.8.1. Determinação da atividade de nitrogenase em meio líquido

Frascos erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml culturas de *A. brasiliense* em meio NFbHPglu líquido, com D.O.₅₄₀ ≈ 1,4-1,8, foram selados com rolhas de borracha ("suba-seal"), e acetileno foi adicionado na concentração final de 10% da fase gasosa. As culturas foram incubadas a 30⁰C em agitador rotatório (110 rpm) por 1 hora. Aliquotas de 0,5 ml da fase gasosa foram retiradas e utilizadas para determinação da quantidade de etileno formado por cromatografia gasosa. Para este fim foi utilizado um cromatógrafo Varian 2440D equipado com coluna Porapak N e detector de ionização de chama. O gás de arraste foi nitrogênio super-seco (fluxo de 20 ml/min). A temperatura da coluna foi de 110⁰C e do detector de 140⁰C. Como padrão foi utilizado etileno padrão 100 ppm (White Martins).

2.8.2. Determinação da atividade da nitrogenase em meio semi-sólido

Cent microlitros de cultura em NFbHPN ou NFbHPglu foram inoculados em frascos tipo penicilina (10 ml) contendo 4 ml de meio NFbHP semi-sólido e incubados a 30⁰C, sem agitação. Após 24 a 48 horas forma-se uma película de células próxima a superfície do meio. Os frascos foram selados com "suba-seal" e injetados com acetileno (10% da fase gasosa). As culturas foram incubadas a 30⁰C sem agitação e amostras da fase gasosa foram retiradas em intervalos de tempo adequados para determinação da quantidade de etileno

formado.

2.8.3. Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas segundo o métodos de Lowry *et al.* (167). Albumina bovina foi utilizada como padrão. A dosagem de proteínas em suspensão de células foi feita após digestão em NaOH 0,5 N durante 30 minutos.

2.9. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas como descrito por Maniatis *et al.* (172). Os géis de agarose foram preparados em tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) ou TAE (Tris-base 40 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e a eletroforese foi desenvolvida no mesmo tampão (172). A concentração de agarose variou de 0,4 a 1,1%, de acordo com o tamanho do fragmento de DNA a ser separado. As amostras, contendo aproximadamente 50-200 ng de DNA, foram aplicadas com tampão de aplicação GSUDS (azul bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, glicerol 50% em $T_{10}E_1$) ou FSUDS (azul de bromofenol 0,2%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em $T_{10}E_1$), na proporção de 1 parte de tampão de aplicação para 1-4 partes de amostra.

As eletroforeses foram desenvolvidas a 8 V/cm por 2-3 horas ou 1-2 V/cm durante 12-16 horas (172). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 μ g/ml) durante

15-30 minutos, descorado em água destilada por até 30 minutos e as bandas de ácido nucleico foram visualizadas em transiluminador ultravioleta de 302 nm. Os resultados foram registrados por fotografia com câmera Minolta de 35 mm equipada com filtro ultravioleta e filtro vermelho utilizando filme Kodak 400 ASA. Os negativos foram revelados com revelador Kodak D-76. Alternativamente os géis foram fotografados com câmera Polaroid utilizando filme Polaroid 667.

2.10. QUANTIFICAÇÃO DE DNA

2.10.1. Quantificação de DNA por espectrofotometria

A concentração de ácido nucleico foi calculada determinando a absorbância da solução de DNA a 260 nm e empregando a seguinte relação: D.O.₂₆₀ \cong 1,0 corresponde a uma concentração de 50 μ g/ml de DNA de dupla fita (172). As preparações de DNA eram consideradas puras quando possuíssem uma relação D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ entre 1,8 e 2,0.

2.10.2. Quantificação de DNA pela complexação com brometo de etídio

A determinação da concentração de ácido nucleico através da complexação com brometo de etídio foi feita como descrita por Maniatis *et al.* (172). Cinco microlitros de diluições seriadas de uma solução de DNA de concentração conhecida e de peso molecular semelhante ao da amostra a ser

testada foram aplicados em um gel de agarose juntamente com uma amostra da solução de concentração desconhecida. Após o desenvolvimento da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g/ml}$) durante 15 minutos, decorado em água bdestilada (30 minutos) e fotografado. A concentração da amostra foi determinada por comparação visual da intensidade das bandas.

2.11. PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

2.11.1. Purificação de plasmídeos em larga escala

A purificação de plasmídeos em larga escala foi feita em gradiente de cloreto de césio/brometo de etídio basicamente como descrito por Maniatis *et al.* (172).

Quinhentos mililitros de cultura (D.O. ₆₀₀ de 2,0-3,0) de *E. coli*, hospedeira do plasmídeo de interesse, foram coletados por centrifugação (5.000 rpm, 4ºC). As células foram ressuspensas em 8 ml de tampão de lise I (Tris.HCl 25 mM, glucose 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) contendo 5 mg/ml de lisozima (adicionada na hora de uso) e incubadas a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Após a adição de 16 ml de NaOH 0,2 N contendo 1% de SDS, a preparação foi cuidadosamente homogeneizada por inversão e incubada em banho de gelo por 10 minutos. A seguir foram adicionados 12 ml de acetato de potássio 5 M pH 4,8 (preparado da seguinte forma: a 60 ml de uma solução de acetato de potássio 5M foram adicionados 11,5 ml de ácido acético glacial e 28,5 ml

de água bdestilada), homogenizado completamente e novamente incubado em banho de gelo por 15 minutos. O sobrenadante foi então coletado (20.000 rpm, 20 minutos, 4°C) e o DNA plasmidial presente foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e centrifugação a 13.000 rpm, 15 minutos, 20°C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 8 ml de T₁₀E₁. Em seguida, oito gramas de cloreto de césio foram lentamente adicionados à preparação anterior. Após completa dissolução do CsCl₂, 1,2 ml de uma solução de brometo de etídio (10 mg/ml) foram adicionados e o índice de refração final da solução foi ajustado para 1,3860. Esta preparação foi centrifugada em ultracentrifuga Beckman L 65B a 44.000 rpm, a 20°C durante 40-48 horas em rotor T160. As bandas de DNA no gradiente foram visualizadas sob luz ultravioleta e coletadas com o auxílio de uma seringa de plástico. As frações coletadas foram extraídas 4 vezes com n-butanol saturado com água bdestilada, dialisadas durante 72 horas contra T₁₀E₁ (com 3 trocas de tampão), precipitadas com 2 volumes de etanol e analisadas por eletroforese em gel de agarose.

2.11.2. Minipreparação de plasmídeos

2.11.2.1. Minipreparação de plasmídeos de E. coli

O isolamento de plasmídeos de E. coli em pequena escala foi feito pelo método da lise alcalina (172).

As células de um mililitro de cultura fresca de E. coli (D.O.₆₀₀ de aproximadamente 2,0) em meio LB foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 100 µl de tampão de lise

I contendo 5 mg/ml de lisozima. Após 5 minutos a temperatura ambiente as células foram lisadas pela adição de 200 μ l de NaOH 0,2 N contendo 1% de SDS e incubadas por 5 minutos em banho de gelo. As proteínas, o DNA cromosomal desnaturado e o SDS foram precipitado pela adição de 150 μ l de tampão acetato de potássio 5 M pH 4,8 e incubação em gelo durante 15 minutos. Após centrifugação (10 minutos, 12.000 g, 4°C) o sobrenadante foi desproteinizado com fenol-clorofórmio (1:1) e o DNA plasmidial da fase aquosa precipitado pela adição de 2 volumes de etanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, secado a vácuo ou sob fluxo de argônio e, em seguida, dissolvido em 20 μ l de $T_{10}E_1$ contendo 10 μ g/ml de RNase. Minipreparações obtidas por este método continham DNA plasmidial suficiente para 20-40 análises eletroforética caso o plasmídeo fosse de alto número de cópias ou 4-6 análises se fosse de baixo número de cópias.

2.11.2.2. Minipreparação de plasmídeo de *A. brasiliense*

As preparações de plasmídeos de *A. brasiliense* foram feitas segundo o método descrito por Robson *et al.* (233). Cerca de 1,5 ml de cultura fresca de *Azospirillum* (D.O. $_{540} \approx 1,0$) em meio NFbHPN foram centrifugados em centrífuga Spin I (InciBrás) por 3 minutos (10.000 rpm, 4°C). O sedimento de células foi ressuspenso em 50 μ l de Tris.HCl 50 mM/EDTA 20 mM pH 8,0 ($T_{50}E_{20}$) e foram adicionados 950 μ l de mistura de lise (EDTA 50 mM contendo 1% de SDS e pH ajustado para 12,6 com NaOH 0,2 M). Após incubação por 25 minutos a 34°C, as proteínas, o SDS e o DNA desnaturado foram precipitados pela

adição de 170 μ l de solução de neutralização (Tris.HCl 0,7 M/NaCl 3,5 M, pH 8,0) seguida de incubação durante 30 minutos em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas (15.000 rpm, 10 minutos, 4 $^{\circ}$ C) e ao sobrenadante foram adicionados 770 μ l de uma solução etanol-acetato (etanol absoluto:acetato de sódio 3 M pH 8,0, 10:1). Esta preparação foi então deixada em repouso a -20 $^{\circ}$ C durante 24 horas e centrifugada a 4 $^{\circ}$ C durante 10 minutos a 10.000 rpm. O precipitado de DNA foi então dissolvido em 20 μ l de tampão T₁₀E₁. Em geral 5-10 μ l das minipreparações obtidas dessa forma eram suficientes para a visualização de plasmídeos de *A. brasiliense* após eletroforese em gel de agarose.

2.12. PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL DE *H. seropedicae*

Células de cem mililitros de uma cultura recente (D.O.₅₄₀ \simeq 1,5) de *H. seropedicae* em meio NFbHPN foram coletadas por centrifugação (5000 rpm, 4 $^{\circ}$ C por 10 minutos), lavadas com T₅₀E₂₀ e ressuspensas em T₅₀E₂₀ contendo 100 mM de NaCl. Após completa ressuspensão das células, foram adicionadas soluções de SDS (10%) até a concentração de 1%, pronase (20 mg/ml) até a concentração de 500 μ g/ml, seguido de incubação a 37 $^{\circ}$ C durante 3-4 horas. O lísado bruto foi então desproteinizado várias vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), até que não houvesse precipitado de proteína na interface. A seguir a solução de DNA foi dialisada por 72 horas, com pelo menos 3 trocas de tampão,

contra 1.000 volumes de $T_{10}E_1$, em saco de diálise previamente tratado (2.4.). Depois de dialisada, a solução de DNA foi tratada com RNase na concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 3 horas a 37^0C , seguida de novas desproteinizações e diálices. A concentração de DNA bem como sua pureza foram estimados espectrofotometricamente (2.10.1.) e seu tamanho foi estimado por eletroforese em gel de agarose (0,3 %), utilizando como referência o DNA do fago λ ~~cl~~ 857 Sam7 intacto (48,5 kb).

2.13. CONDIÇÕES DE DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

2.13.1. Soluções tampão e condições gerais

As condições utilizadas para a digestão de DNA com enzimas de restrição foram aquelas especificadas pelo fabricante ou por Maniatis *et al.* (172). Um sistema de três soluções tampão com diferentes concentração de NaCl foi utilizado. A fórmula destes tampões são as seguintes (17,172):

Tampão de baixa concentração salina:

Tris.HCl 10 mM pH 7,5 (37^0C)

MgCl_2 10 mM

DTT 1 mM

Tampão de concentração salina média:

Tris.HCl	50 mM pH 7,5 (37 ⁰ C)
NaCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

Tampão de alta concentração salina:

Tris.HCl	100 mM pH 7,5 (37 ⁰ C)
NaCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

Alternativamente o tampão TAS foi utilizado. A maioria das enzimas de restrição conhecidas possuem boa atividade neste tampão (17).

Tampão TAS:

Tris-Aacetato	66 mM pH 7.9 a 37 ⁰ C
Acetato de Mg	10 mM
acetato de K	66 mM
DTT	0.5 mM

Usualmente 1-5 unidades de enzima das diferentes enzimas de restrição foram utilizadas para digestão de 0,2-1 μ g de DNA em um volume de 20 μ l durante 1-4 horas na presença do tampão adequado a 37⁰C.

2.13.2. Determinação das condições de hidrólise parcial do DNA de H. seropedicae.

Reações de digestão de um micrograma de DNA total de H. seropedicae com a enzima Sal I diluída em série (de 1 μ l a 0,0156 μ l) foram feitas num volume de 20 μ l. O tampão utilizado foi o de alta concentração salina e a digestão foi conduzida a 37⁰C durante exatamente 1 hora. As diversas misturas de reação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,9%, tendo-se utilizado o DNA do fago lambda digerido com Sal I como padrão de peso molecular (possui 3 fragmentos: 32,7 kb, 15,2 kb e 0,5 kb) (17). A diluição da enzima que produziu a maior quantidade de fragmentos com 15,2 a 32,7 kb foi determinada por comparação visual.

2.13.3. Digestão de DNA do H. seropedicae em larga escala

DNA total de H. seropedicae (500 μ g) foi digerido nas mesmas condições utilizadas na reação piloto, mas usando apenas a metade da concentração de enzima Sal I necessária para produzir a maior concentração de fragmentos na faixa de 15-32 kb (172). Um micrograma desta reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,9% para verificar a extensão da digestão.

2.13.4 Digestão do plasmídeo pVK102 em larga escala

Vinte microgramas do DNA do plasmídeo pVK102, purificado em gradiente de cloreto de césio/brometo de etídio, foram digeridos com Sal I a 37⁰C durante 1 hora em um volume de 100 μ l. Um microlitro desta mistura de reação

(0,2 μ g) foi analisado por eletroforese em gel de agarose para se determinar a extensão da hidrólise. O DNA lambda digerido com Sal I foi utilizado como referência de peso molecular.

2.14. FRACIONAMENTO DOS FRAGMENTOS DO DNA DE *H. seropedicae* PARCIALMENTE HIDROLIZADO POR Sal I

Os fragmentos resultantes da hidrólise parcial do DNA de *H. seropedicae* com Sal I foram precipitados e o sedimento, dissolvido em 2 ml de $T_{10}E_1$, foi aplicado em um gradiente descontínuo de sacarose (10-40%).

O gradiente de sacarose foi montado utilizando soluções de sacarose de 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% e 10% preparadas em tampão Tris.HCl 20 mM pH 8,0 contendo EDTA 5 mM e NaCl 1 M. Dez mililitros destas soluções foram submetidos ao forno de microondas (Sanyo-Prosdóximo) 2 vezes na potência máxima, durante 3 minutos. Destes, 7 ml de cada solução foram cuidadosamente dispensados em um tubo de nitrocelulose (Beckman) iniciando pela de maior concentração e terminando pela de menor concentração. O gradiente foi deixado em repouso durante 3 horas a 8 0 C. Após a aplicação do DNA parcialmente hidrolizado no topo do gradiente, este foi submetido a centrifugação usando um rotor SW 25.2 (24.000 rpm, 20 0 C) durante 24 horas, para migração e equilíbrio. Frações de aproximadamente 0,5 ml foram coletadas e analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,4%. As

frações que continham fragmentos de DNA entre 15-32 kb foram combinadas, dialisadas, extraídas com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), concentradas por extração com n-butanol e precipitadas com 2 volumes de etanol. O DNA precipitado foi dissolvido em $T_{10}E_1$ na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$. A concentração de DNA foi estimada pelo método espectrofotométrico (2.10.1.).

2.15. LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA

Os fragmentos de DNA contendo pontas coesivas dos vetores e dos insertos a serem ligados foram misturados, precipitados com etanol absoluto e lavados com etanol 70%. O DNA foi então dissolvido em 17 μl de água bidestilada, aquecido durante 5-10 minutos a 65^0C e rapidamente resfriado em gelo. Dois microlitros de tampão de ligase 10X concentrado (Tris.HCl 660 mM, MgCl_2 50 mM, DTT 50 mM, ATP 10 mM, pH 7,5) (172) e 1 μl da enzima T4-DNA ligase (0,5-1 unidade) foram adicionados. A mistura de reação foi então homogeneizada e incubada a $16-22^0\text{C}$ durante 12-24 horas. Em seguida, 1 μl desta mistura foi analisado por eletroforese em gel de agarose para verificar a extensão da ligação.

Fragmentos com pontas cegas foram ligados da mesma maneira. Quando os fragmentos a serem ligados possuíam pontas coesivas diferentes, as extremidades foram preenchidas com a adição de 0,5 mM de dNTP e 0,1-0,5 μl (1-4 $\text{U}/\mu\text{l}$) da enzima Klenow (fragmento maior da DNA polimerase I

de E. coli), 5 minutos antes da adição de T4-DNA ligase.

2.16. EMPACOTAMENTO DO DNA EM PARTÍCULAS DE FAGO LAMBDA "IN VITRO"

O preparo do extrato de empacotamento de DNA "in vitro" foi feito por um procedimento modificado daqueles descritos por Maniatis *et al.* (172) e por Goldenberg *et al.* (99).

2.16.1. Preparo do extrato de empacotamento sonicado

A partir do estoque em glicerol a E. coli estirpe BHB 2690, lisogênica, foi semeada por esgotamento em placa contendo meio LA. Uma colônia foi inoculada em 10 ml de meio LB e a cultura incubada sob forte aeração a 30⁰C por 14-16 horas. Esta mesma colônia foi então semeada em duas placas contendo meio LA e incubada a 30⁰C e a 42⁰C, para a verificar se a estirpe continuava lisogênica. A presença de mutação cl857 do fago lambda integrado ao cromosoma impede o crescimento da E. coli à temperatura de 42⁰C (172). A cultura em meio LB foi então utilizada como inóculo para 220 ml do mesmo meio pré-aquecido a 30⁰C, contidos em um frasco Erlenmeyer com capacidade para 1 l (D.O. ₆₀₀ inicial da mistura foi de aproximadamente 0,1). A cultura foi incubada a 30-32⁰C e 180 rpm até atingir a D.O. ₆₀₀ de 0,3 (cerca de 2 horas). A indução da síntese de proteínas do fago foi feita incubando-se a cultura em um banho de água a 45⁰C durante 20 minutos, seguida de incubação a 38-39⁰C durante 3 horas, com

agitação manual. Nesta fase, 1 mililitro da cultura foi testado para indução adicionando 3 gotas de clorofórmio: culturas induzidas tornam-se translúcida prontamente (1-3 minutos). A cultura foi então deixada em repouso durante 10 minutos em banho de gelo e as células coletadas por centrifugação suave (4.000 rpm, 5 minutos, 2ºC). O sedimento celular foi então ressuspenso em 1,8 ml de tampão de sonicacão gelado (Tris.HCl 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, $MgCl_2$ 3 mM, pH 8,0) e as células foram sonicada (ultrasonicador Lab-Line) em pulsos de 3 segundos (força máxima) com intervalos de 30 segundos em banho de gelo entre os pulsos. Esta operação foi repetida até que o material se tornasse translúcido e com baixa viscosidade. Finalmente o extrato obtido foi centrifugado a 12.000 rpm e 4ºC durante 10 minutos e distribuídos em tubos plásticos de 1,5 ml gelados em frações de 50 μ l. Estas frações do extrato sonificado foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, onde foram mantidas estocadas.

2.16.2. Preparo do extrato de empacotamento por congelamento/descongelamento

E. coli estirpe BHB 2688 foi utilizada para o preparo deste lisado. O inóculo, teste de lisogenia, condições de cultivo, indução e teste de indução foram idênticos aos descritos na seção anterior. A cultura induzida foi centrifugada (5.000 rpm, 4ºC, 5 minutos) e as células foram ressuspensas em 1,4 ml de sacarose 10% em tampão Tris.HCl 50 mM pH 8,0, estéril. Duzentos microlitros de uma solução de

lisozima (2 mg/ml em tampão Tris.HCl 0,25 M pH 8,0) foram imediatamente adicionados e a suspensão de células congelada em nitrogênio líquido e deixada descongelar em banho de gelo. Cem microlitros de tampão de empacotamento (Tris.HCl 6 mM, espermidina 50 mM, $MgCl_2$ 20 mM, ATP 30 mM, β -mercaptoetanol 30 mM, pH 8,0) foram adicionados ao lisado e, em seguida, centrifugado a 35.000 rpm e 4⁰C durante 30 minutos, em rotor SW 65K. Aliquotas de 50 μ l desta preparação foram distribuídas em tubos plásticos de 1,5 ml gelados e foram rapidamente congeladas e estocadas em nitrogênio líquido.

2.16.3. Reação de empacotamento "in vitro"

O empacotamento "in vitro" foi feito de acordo com aquele descrito por Goldenberg *et al.* (99). O DNA do fago lambda L47.1 intacto foi utilizado para verificar a eficiência de empacotamento. A 1-10 μ l de uma solução de DNA (0,1-1 μ g) foram adicionados 7 μ l de tampão de sonicação (2.16.1.), 2 μ l de tampão de empacotamento (2.16.2.), 8 μ l de extrato sonicado (2.16.1.) e 12 μ l de lisado congelado-descongelado (2.16.2.) , nesta ordem. Os extratos de empacotamento foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados em banho de gelo. A mistura de reação de empacotamento foi incubada a 25⁰C durante 1 hora e interrompida pela adição de 500 μ l de SM (Tris.HCl 5mM, $MgCl_2$ 2 g/l, NaCl 5,8 g/l, gelatina 0,1 g/l, pH 8,0) e 5 μ l de clorofórmio. A eficiência de empacotamento obtida foi de $\simeq 10^6$ pfu/ μ g de DNA λ L47.1.

O empacotamento de cosmídeos recombinantes foi feito do mesmo modo, apenas utilizando a mistura de reação de ligação ao invés do DNA do fago lambda.

2.17. INFECÇÃO DE E. coli COM FAGO LAMBDA

A infecção de cultura de E. coli com fago lambda foi feita essencialmente como descrito por Maniatis *et al.* (172). Cerca 10-100 μ l de uma suspensão de fago foram adicionados a 200 μ l de um cultura de E. coli HB 101 crescida durante 14-20 horas em LB suplementado com 0,2% de maltose. Esta mistura foi incubada durante 20 minutos a 37⁰C e, após a incubação, foram adicionados 3 ml de meio LA contendo 0,6% de ágar a uma temperatura de aproximadamente 45⁰C e imediatamente espalhados sobre placas contendo meio LA. Os halos de lise normalmente eram visíveis e contados depois de 10-12 horas de incubação a 37⁰C.

2.18. PURIFICAÇÃO DO DNA DO FAGO LAMBDA

2.18.1. Purificação do DNA do fago λ L47.1

Uma cultura de E. coli HB 101 foi infectada com aproximadamente 10^3 - 10^4 fagos, como descrito na seção anterior. Após 12-14 horas a camada de bactérias apresentava halos de lise confluentes. As partículas de fago foram extraídas lavando a superfície do ágar com 5 ml de SM

durante 3 horas a 8⁰C. O líquido sobrenadante foi recolhido e mais cinco mililitros de SM foram adicionados e a lavagem repetida. O SM recolhido da placa nas duas lavagens foi misturado, centrifugado durante 5 minutos a 5.000 rpm e o sedimento desprezado. As partículas de fago presentes no sobrenadante foram coletadas por centrifugação a 20.000 rpm durante 1 hora, a 4⁰C. Um precipitado translúcido formou-se no fundo do tubo. Para o isolamento do DNA do fago lambda, este precipitado foi ressuspensão completamente em 200 µl de T₁₀E₁ e transferido para um tubo plástico de 1,5 ml. As partículas virais foram lisadas pela adição de 20 µl de EDTA 0,5 M, 25 µl de SDS 10% e 6,25 µl de pronase e incubação a 37⁰C durante 3 horas. A solução de DNA foi em seguida desproteinizada com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) várias vezes, precipitada com 2 volumes de etanol e solubilizada em T₁₀E₁. A concentração final de DNA na preparação foi estimada pelo método de complexação com brometo de etídio (2.10.2.).

2.18.2. Purificação do DNA do fago λclts857 Sam7

O DNA do fago λclts857 Sam7 foi purificado a partir da estirpe lisogênica de E. coli C600 λclts857 Sam7 como descrito por Maniatis et al. (172).

Para testar a presença do fago no genoma da estirpe, uma colônia foi semeada em duas placas contendo meio LA, que foram incubadas a 30 e 42⁰C. Em altas temperaturas o produto do gene mutado cl é inativado permitindo o crescimento do fago e o prosseguimento do ciclo lítico. Não houve

crescimento na placa incubada a 42⁰C. Uma colônia da placa incubada a 30⁰C foi inoculada em 20 ml de meio LB e incubada durante 14 horas a 30⁰C e 150 rpm. Esta cultura foi usada como inoculo para 800 ml de meio LB (em frasco erlenmyer de 2 l). A densidade ótica inicial a 600 nm da cultura foi de 0,1. Em seguida a cultura foi incubada a 30⁰C e 150 durante 3 horas ($D.O_{600} = 0,6$). A cultura foi então submetida a choque térmico a 45⁰C durante 15 minutos, sob agitação manual constante, e novamente incubada a 30⁰C durante mais 2 horas. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 4⁰C, 5 min), sedimento ressuspensão em 10 ml de tampão Tris.HCl 10 mM, pH 8,0 contendo MgCl₂ 10 mM. Clorofórmio (10 gotas) foi adicionado ao tubo e agitado em agitador vortéx até a obtenção de uma massa compacta. Um volume de clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado ao tubo, novamente agitado e as fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação (12.000 rpm, 4⁰C, 15 minutos). A fase aquosa foi recolhida e a fase orgânica foi lavada com 5 ml de Tris.HCl 10 mM/MgCl₂ 10 mM, pH 8,0. As fases aquosas foram reunidas e centrifugadas a 20.000 rpm (4⁰C) durante 1 hora. O sedimento translúcido foi dissolvido em 2 ml de SM com agitação e foram adicionados SDS 10% (concentração final 0,5%), pronase 20 mg/ml (concentração final 0,5 mg/ml) e EDTA 0,5 M (concentração final 20 mM). Após incubação por 4 horas a 37⁰C a preparação foi desproteínizada com clorofórmio-álcool isoamílico 3 vezes e dialisada 4 vezes contra 3 litros de T₁₀E₁ (24 horas, 4⁰C). A concentração de DNA foi determinada utilizando o método espectrofotométrico

(2.10.1.).

O DNA do fago λc1857Sam7 foi utilizado como padrão de peso molecular intacto (48,5 kb) ou digerido com Sal I (produzindo os fragmentos de 32,7 kb, 15,2 kb e 0,5 kb) (17).

2.19. CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE H. seropedicae

Fragmentos Sal I de DNA de H. seropedicae (\approx 3,5 μ g), com peso molecular entre 15,2 e 32,7 kb, foram ligados a aproximadamente 1 μ g do cosmídio vetor pVK102 linearizado com a enzima Sal I, em um volume de 10 μ l, como descrito na seção 2.13.4. A mistura de ligação foi incubada a 4⁰C durante 60 horas. A concentração de DNA na reação de ligação foi alta (\approx 450 μ g/ml) para favorecer a formação de concatâmeros de alto peso molecular, uma vez que estas moléculas são empacotadas com maior eficiência (172). Dois microlitros da reação de ligação foram empacotados como descrito na seção 2.16.3. Vinte microlitros da mistura de empacotamento foram utilizados para infectar 200 μ l de E. coli HB101, crescida em meio LB suplementado com maltose (0,2%). Após incubação de 20 minutos a 37⁰C, um mililitro de meio LB foi adicionado à mistura de infecção e novamente incubado por mais 1,5 horas sem agitação. Esta mistura de infecção foi então plaqueada em meio LA contendo 50 μ g/ml de canamicina. Colônias resistentes a canamicina e sensíveis a tetraciclina foram coletadas, estocadas em 50% de glicerol (-20⁰C) e constituem o banco de genes de H. seropedicae.

2.19.1. Cálculo da representatividade do banco de genes

A representatividade do banco genômico foi calculada pela seguinte fórmula (42):

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

calculando para P,

$$P = 1 - e^{N \cdot \ln(1-f)}$$

onde P é a probabilidade, f é fração do genoma em um único recombinante e N é o número necessário de recombinantes.

2.20. CONJUGAÇÃO

A transferência de plasmídeos por conjugação foi feita como descrita por Pedrosa e Yates (214,215).

2.20.1. Transferência plasmídeos auto-transmissíveis por conjugação

A formação do "pilus" conjugativo e a transferência do plasmídeo para a bactéria receptora depende de um conjunto de genes, os chamados genes tra (112). Plasmídeos que possuem os genes tra, como o plasmídeo R68.45 (109), são auto-transmissíveis entre bactérias gram-negativas e em altas frequências (112). Por outro lado existe um grupo de

plasmídeos que não possuem os genes tra, mas são transmissíveis exigindo, contudo, a presença de genes tra em "trans", isto é, em outro plasmídeo ou no cromosoma (112). Estes plasmídeos são chamados plasmídeos mobilizáveis.

A transferência do plasmídeo R68.45 (tra⁺) de E. coli para A. brasiliense foi feita misturando a cultura em meio LB de E. coli (R68.45) com a cultura de A. brasiliense em meio NFbHPN, ambas as culturas em fase logarítmica de crescimento, na proporção de 1 para 10 (100 µl de E. coli e 1 ml de A. brasiliense). A mistura foi centrifugada por 3 minutos em microcentrifuga, lavada com 1 ml de LB, plaqueada em meio LA/NFbHPN (1:1) e incubada a 30⁰C durante 20-24 horas. A massa de células crescida durante a conjugação foi raspada, suspensa em 1 ml de NFbHP, diluída em meio NFbHP (10^{-2} - 10^{-8}) e plaqueada em meios de seleção apropriados. A frequência de conjugação por receptor foi calculada dividindo o número de A. brasiliense que receberam plasmídeo, transconjugantes, pelo número total de A. brasiliense na mistura de conjugação, determinados em meio seletivos e não seletivo (NFbHPN), respectivamente.

2.20.2. Transferência de plasmídeos mobilizáveis por conjugação

Quando o plasmídeo a ser transferido era mobilizável os genes tra foram supridos em "trans" pelo plasmídeo pRK2013. Este plasmídeo possui os genes tra e o seu replicon é o ColE1 (82) sendo instável em A. brasiliense. Culturas de E. coli contendo o plasmídeo de interesse e outra contendo o

plasmídeo pRK2013, cultivadas em meio LB suplementado com os antibióticos adequados, foram misturadas com uma cultura de *A. brasiliense*, na proporção de 1:1:10. O tratamento subsequente foi exatamente igual ao descrito anteriormente. Alternativamente, a funções dos genes tra podiam ser supridas pelo uso de *E. coli* S17.1, que possue integrado em seu cromossoma os genes tra do plasmídeo RK4 (246). Quando o plasmídeo de interesse era albergado por esta estirpe, a cultura de *E. coli* S17.1 (doadora) foi misturadas com a cultura de *A. brasiliense* na proporção de 1:10 e o procedimento posterior foi o mesmo.

2.21. TRANSFORMAÇÃO

A transformação de estirpes de *E. coli* com DNA plasmidial foi feita como descrito por Maniatis *et al.* (172).

2.21.1. Preparo de células de *E. coli* competentes

Cem mililitros de meio LB pré-aquecido a 37⁰C foram inoculados com 1 ml de um cultura recente de *E. coli* (D.O. ₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,02) e incubada a 37⁰C sob forte agitação (\approx 200 rpm) durante cerca de 2 horas (D.O. ₆₀₀ final de 0,3-0,5). A cultura foi então resfriada em banho de gelo durante 10 minutos e as células coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 4⁰C, 5 min). O sedimento de células foi ressuspenso em 50 ml de tampão de transformação

(Tris.HCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 8,0), incubado em gelo durante 30 minutos e novamente centrifugado. As células tornadas competentes pelo tratamento com CaCl₂ foram finalmente ressuspensas em 6,6 ml de tampão de transformação e alíquotas de 0,2 ml desta suspensão foram distribuídas em tubos plásticos de 1,5 ml, estéreis e gelados. Glicerol, na concentração final de 15%, podia ser adicionado ao tampão de transformação nesta última etapa e as células competentes estocadas em nitrogênio líquido durante pelo menos seis meses.

2.21.2. Transformação de células competentes com DNA

A cada alíquota de 0,2 ml de células competentes foram adicionados 1-20 μ l (1-50 ng) de solução de DNA em T₁₀E₁ ou da mistura de ligação e incubadas em banho de gelo durante 30 minutos. Em seguida, a suspensão de células foi submetida a um choque térmico de 42⁰C por 3 minutos em banho-maria e finalmente incubada em gelo por mais 5 minutos. Um mililitro de meio LB foi então adicionado a cada tubo e incubado a 37⁰C durante 1-3 horas, para permitir a expressão dos genes de resistência a antibióticos. O conteúdo de cada tubo foi plaqueado em meio LA contendo os antibióticos adequados e nas diluições apropriadas. Plasmídeos intactos produziam normalmente cerca 10⁵-10⁷ transformantes/ μ g de DNA.

Para transformar células de E. coli estirpe MC1061 foi utilizado o mesmo procedimento, mas o tampão de transformação foi substituído por solução de CaCl₂ 100 mM (M.G. Yates, comunicação pessoal).

2.21.3. Transformação rápida

Células de 1 ml de uma cultura recente de *E. coli* em meio LB (D.O. ₆₀₀ \simeq 1,0-2,0) ou uma alçada células de uma placa contendo meio LA foram suspensos em 0,2 ml de CaCl_2 100 mM ou Tris.HCl 10 mM/ CaCl_2 50 mM pH 8,0, e incubadas em banho de gelo durante 30-40 minutos. Cem a quinhentos nanogramas de DNA (até 50 μl) foram adicionados e a suspensão foi novamente incubada em gelo por mais 30 minutos. As células foram então submetidas a um choque térmico de 3 minutos a 42⁰C e reincubadas em gelo por mais 5 minutos. Após a adição de 1 ml de meio LB, as células foram incubadas a 37⁰C por 1 hora para expressão da resistência ao antibiótico e plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos adequados. As colônias resistentes ao antibiótico presente no meio seletivo foram isoladas e testadas para a presença de plasmídeos.

2.22. CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE RESTRIÇÃO DE PLASMÍDEOS

O plasmídeo a ser mapeado foi purificado em larga escala em gradiente de CsCl_2 /brometo de etídio (2.11.1.) ou por minipreparação (2.11.2.1.). O DNA plasmidial foi submetido à digestão com diversas enzimas de restrição, separadamente ou em combinações de duas ou três enzimas, e o produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose. A determinação dos pesos moleculares dos fragmentos

produzidos pelas digestões simples ou múltiplas e a análise comparativa destes resultados permitiram a dedução do mapa de restrição dos vários plasmídeos.

2.23. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE

2.23.1. Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose com papel de DEAE-celulose

A purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose foi feita essencialmente como descrito por Dretzen *et al.* (57). O plasmídeo foi isolado de 50-100 ml de uma cultura de *E. coli* como descrito para minipreparação (2.11.2.1.), mas os volumes dos reagentes foram ajustado de acordo com o volume de cultura utilizado. O DNA plasmidial (1-5 μ g) foi submetido a digestão com a enzima de restrição adequada e os fragmentos separados em gel de agarose (0,6%) preparativa (poço de 40 mm de comprimento, 1 mm de largura e 5 mm de altura). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Aproximadamente 1 mm abaixo da banda desejada, o gel foi cortado e uma fita de papel de DEAE-celulose (DE81, Whatman) embebida em TBE foi inserida cuidadosamente e a corrida eletroforética foi reiniciada. Antes de ser utilizado, o papel de DEAE-celulose foi tratado com NaCl 2,5 M por algumas horas e lavado com água bdestilada. Quando toda a banda de DNA estava adsorvida (cerca de 15-20 minutos de corrida adicional) a fita de papel foi retirada, lavada ligeiramente com água

bidestilada gelada e suspensa em tampão de extração (Tris.HCl 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,5) numa proporção de 300 μ l de tampão para cada 50 mm² de papel. A suspensão foi vigorosamente agitada para desfazer o papel, incubada a 37⁰C durante 2-24 horas e filtrada através de lã de vidro siliconizada. O filtrado, contendo o fragmento de DNA purificado, foi então concentrado por extração com n-butanol e precipitado com 2 volumes de etanol.

2.23.2. Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão

A purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão foi feita conforme descrito por Bankier *et al.* (10), com modificações. O plasmídeo foi isolado e digerido como descrito no item anterior. Os fragmentos foram então separados eletroforeticamente em gel de agarose (0,7-1,0%) de baixo ponto de fusão de forma idêntica àquela descrita na seção 2.9. e utilizando tampão TAE. Após a coloração com brometo de etídio, a fração de gel contendo a banda correspondente ao fragmento de interesse foi cortada sob luz ultravioleta (302 nm). A porção de gel contendo DNA de interesse foi então fundida a 65⁰C por 5 minutos, sendo a seguir adicionados Tris.HCl, EDTA e NaCl nas concentrações finais de 10 mM, 1 mM e 0,2 M, respectivamente. Um volume de fenol equilibrado com tampão Tris.HCl foi adicionado ao gel fundido e a mistura foi agitada vigorosamente. Após centrifugação a 10.000 rpm em centrífuga Spin I (Incibrás) durante 3 minutos a fase aquosa foi coletada e o fenol

extraído com um volume de $T_{10}E_1$. As fases aquosas contendo o DNA foram reunidas e extraídas novamente com fenol. Se o volume fosse muito grande o DNA era concentrado pela extração com n-butanol e posteriormente precipitado com 2/3 volumes de acetato de amônio 5 M e 2 volumes de etanol.

2.24. MARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

2.24.1. "Nick-translation"

A marcação de DNA com ^{32}P por "nick-translation" foi feita como descrita por Rigby *et al.* (228). Foram adicionados a um tubo 10 μ l de solução de DNA (0,5-1 μ g), 5 μ l de tampão de "nick-translation" 10x concentrado (Tris.HCl 500 mM, $MgSO_4$ 100 mM, DTT 1 mM e albumina bovina PENTAX fração V 500 μ g/ml), 1 μ l de solução 1 mM de cada um desoxinucleotídeo não marcados (dCTP, dGTP e dTTP), 5 μ l de solução de DNase I (pâncreas bovino) (0,01 μ g/ml, em tampão "nick-translation" 1x), 1 μ l (1-2 unidades) de DNA-polimerase I de *E. coli* e, por último, 10 μ l de [α - ^{32}P]dATP (100 μ Ci), em um volume final de 50 μ l. O sistema de reação foi incubado a 16°C durante 1 hora ou até que houvesse 20% de ^{32}P incorporado ao DNA. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 μ l de EDTA 0,5 M.

2.24.2. Marcação de fragmentos de DNA por síntese utilizando hexadesoxinucleotídeos como "primer"

O fragmento de DNA (cerca de 30-50 ng) a ser marcado foi desnaturado por fervura durante 10 minutos e rapidamente resfriado em banho de gelo. Ao tubo contendo DNA (10 μ l) foram adicionados 5 μ l de tampão OCB, 1 μ l de albumina bovina (10 mg/ml), 2,5 μ l (25 μ Cl) de [α -³²P]dCTP (Amersham), 0,5 μ l de enzima Klenow (1-2 unidades) e água bidestilada suficiente para 20 μ l (81). A mistura de reação foi incubada a temperatura ambiente durante 1-24 horas. O tampão OCB (81) continha tampão MOPS 1 M pH 6,6, tampão Tris.HCl 0,25 M pH 8,0, MgCl₂ 0,025 M, dNTP (dATP, dGTP e dTTP) 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM e 27 mil unidades OD₂₆₀ de hexadesoxinucleotídeos. Quando as sondas foram sintetizadas por este método geralmente foram incorporados cerca de 75% da radioatividade ao DNA, eliminando-se assim a necessidade de purificação.

2.24.3. Marcação com dUTP-digoxigenina

A marcação com dUTP-digoxigenina foi feita utilizando o "Genius Nonradioactive DNA Labelling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim Biochemicals) e conforme as instruções do fabricante (18).

2.25. DETERMINAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS MARCADOS COM ^{32}P AO DNA

A extensão de marcação radioativa do DNA foi determinada como descrito por Maniatis *et al.* (172). Amostras de 1-5 μl de uma diluição da reação de "nick-translation" (1:50-1:100) foram depositadas sobre 2 pedaços de papel de DEAE-celulose (0,5 cm x 0,5 cm). Um destes pedaços foi lavado seis vezes com Na_2HPO_4 0,5 M durante 5 minutos, 2 vezes com água bdestilada e 2 vezes com etanol 95%. Após secagem dos dois pedaços de papel contendo DNA adsorvido, a radiatividade de cada um foi determinada em contador de cintilações líquidas Beckman LS-133 utilizando o líquido de Bray (21) como líquido cintilador. A relação entre o número de cintilações por minuto no papel lavado (radioatividade incorporada) e no papel não lavado (radioatividade total), multiplicada por 100, é igual à percentagem de incorporação de nucleotídeos marcados com ^{32}P ao DNA.

2.26. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA MARCADOS COM ^{32}P

Os fragmentos marcados por "nick-translation" foram purificados em coluna de Sephadex G-50 como descrito por Maniatis *et al.*, (172).

2.26.1. Preparo do gel de Sephadex G-50

Trinta gramas de Sephadex G-50 foram suspensos em 500 ml de tampão STE (Tris.HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), deixados em repouso durante uma noite e, então, fervidos durante 1 hora. A resina preparada deste modo pode ser estocada a 4°C em STE.

2.26.2. Cromatografia de DNA marcado com Sephadex G-50.

Um mililitro da suspensão do gel foi depositado em uma seringa plástica de 1 ml de capacidade com o fundo obturado com lã de vidro siliconizada. Esta seringa foi submetida a centrifugação em centrífuga clínica durante 5 minutos, a aproximadamente 1.000 rpm. O volume de gel foi completado e as etapas anteriores repetidas até que se obtivesse um volume de gel empacotado de aproximadamente 1 ml. Gem microlitros da solução de DNA marcado com ^{32}P (o volume da reação de "nick-translation" foi completado para 100 μl com STE) foram aplicados à coluna, a qual foi submetida a centrifugação nas mesmas condições anteriores e o eluato coletado em um tubo plástico de 1,5 ml. Cerca de 60-90% do DNA marcado foi recuperado neste procedimento.

2.27. TRANSFERÊNCIA DO DNA DO GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE OU DE NYLON

As transferências de DNA para membranas de nylón (Hybond-N, Amersham) ou nitrocelulose (Millipore HAWP,

Millipore) foram feitas como descrito (172,3). Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose, visualizados e fotografados como descrito na seção 2.9. Uma régua foi fotografada ao lado do gel para servir como referência para as distâncias de migração dos fragmentos. Após a remoção dos poços de aplicação, o gel foi tratado com a solução desnaturante (NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M) durante 30 minutos, lavado ligeiramente com água bdestilada e tratado com solução neutralizante (Tris.HCl 1,0 M/NaCl 1,5 M) por mais 30 minutos. Foram usados cerca de 200 ml destas soluções para géis de 35-100 cm² de área e 0,5 cm de altura. Alternativamente, o gel foi tratado com HCl 0,25 M durante 10-15 minutos, e então com soluções desnaturante e neutralizante. Este último procedimento foi usado principalmente quando os fragmentos a serem transferidos foram de alto peso molecular (>5kb). Após estes tratamentos o gel foi colocado cuidadosamente sobre uma tira de papel 3MM (Whatman) da mesma largura do gel, mas comprido o suficiente para formar uma ponte entre o tampão e o gel. Este conjunto foi colocado sobre uma plataforma de vidro ou acrílico e então dentro de uma cuba contendo 0,5-1 litro de SSC 20X (NaCl 3M/ citrato de sódio 0,15 M, pH ajustado para 7,0 com NaOH 1N)). O nível do tampão ficava abaixo do nível da plataforma de vidro e as pontas do papel 3MM formavam uma ponte entre o gel e o tampão da cuba. As bolhas entre o gel e o papel foram cuidadosamente removidas. A membrana de nitrocelulose, umedecida com SSC 2X, ou a membrana de nylon seca, cortada 1 mm maior que o gel em cada dimensão e

Identificada a lápis, foi cuidadosamente colocada sobre o gel de maneira que a borda inferior dos poçinhos estivessem justapostos à borda da membrana. Este procedimento foi utilizado para que não ocorressem erros na determinação dos pesos moleculares. Todas as bolhas de ar entre o gel e a membrana foram escrupulosamente removidas. Sobre a membrana foram colocadas 3 folhas de papel 3MM cortadas exatamente do tamanho do gel e, sobre estas, foi colada uma pilha de papel absorvente com cerca de 10 cm de altura e finalmente um peso de 1 kilograma. Normalmente a transferência ocorria durante 24 horas e, eventualmente, durante 48 horas. O nível do tampão SSC 20X foi mantido durante a transferência. A membrana foi então removida, lavada com SSC 5X e seca a 37°C durante 15-30 minutos. O DNA foi fixado à membrana de nitrocelulose em estufa a 85°C durante 2,5 horas e a membrana de nylon por irradiação de luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador durante 3-5 minutos. A membrana com DNA fixado pode ser usada imediatamente para hibridização ou ser guardada por até 15 dias em dessecador e à temperatura ambiente.

2.28. HIBRIDIZAÇÃO

As hibridizações foram feitas por procedimento modificado daquele descrito por Johnson *et al.* (144) ou segundo o manual Amersham (3) ou ainda de acordo com o procedimento especificado por Boehringer Mannheim

Biochemicals (18).

2.28.1. Hibridização utilizando leite desnatado Molico como agente bloqueador

O filtro de nitrocelulose contendo DNA foi umedecido com solução de Molico (leite desnatado da Nestlè) 0,3% em SSC 6X e incubado à temperatura de hibridização (55⁰C) por 2 horas. O filtro foi então colocado em um saco plástico e 50 a 100 µl de solução de Molico foram adicionados para cada cm² de área da membrana. A sonda radioativa, desnaturada em banho fervente durante 10 minutos, foi adicionada ao saco plástico que foi selado e incubado durante 18-24 horas à temperatura de hibridização.

Hibridizações em condições de alta estringência foram conduzidas a 65⁰C e as membranas lavadas 2 vezes com solução de Molico em SSC 6X contendo 0,1% de SDS, durante 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir foram lavadas mais duas vezes com SSC 0,1X contendo 0,1% de SDS a 65⁰C durante 30 minutos. Em cada lavagem foram usados 200 ml de tampão. A membrana foi seca e exposta a filme de raios-X Kodak X-Omat XK-1 ou BRAF, com ou sem placa amplificadora, durante 1-7 dias a -50⁰ C.

Hibridizações em condições de baixa estringência foram conduzidas a 55⁰C. A membrana foi lavada duas vezes com leite Molico 0,3% em SSC 6X contendo 0,1% de SDS durante 30 minutos à temperatura ambiente e mais duas vezes com SSC 2X contendo 0,1% de SDS, a 55⁰C durante 15 minutos. Em cada lavagem foram usados 200 ml de cada tampão. A membrana foi

seca e autoradiografada com filme Kodak X-Omat XK-1 ou filme BRAF durante 1-7 dias a -20⁰C utilizando 2 placas amplificadoras (Dupont, Cronex Hi-Plus). O filme foi revelado com revelador a base de metol-hidroquinona (126).

2.28.2. Hibridizações utilizando a solução de Denhardt como agente bloqueador

A membrana de nylon contendo DNA foi colocada em um saco plástico e incubada com solução de pré-hibridização (SSC 5X, solução de Denhardt 5X, 0,5% SDS, 20 µg/ml de DNA de timo, 35% de formamida) a 42⁰C durante 2-12 horas (baixa estringência). Aproximadamente 100 µl desta solução foi utilizada para cada cm² da membrana. A solução de Denhardt 100X contendo 2% de albumina bovina, 2% de Ficoll e 2% de polivinilpirrolidona era filtrada por filtro Millipore 0,45 µm e em seguida estocada a -20⁰C (3,172). A sonda radioativa foi desnaturada em banho fervente durante 10 minutos, rapidamente resfriada em gelo e adicionada ao saco plástico. A mistura de hibridização foi incubada durante 12-18 horas a 42⁰C, com agitação rotatória. A membrana foi então lavada duas vezes com SSC 2X à temperatura ambiente durante 30 minutos e mais duas vezes com o mesmo tampão a 65⁰C. Em cada lavagem foram usados cerca de 200 ml de tampão. Depois de seca, a membrana foi autoradiografada como descrito anteriormente.

2.28.3. Hibridização utilizando prova marcada com dUTP-digoxigenina

A hibridização utilizando como prova fragmento marcado com dUTP-digoxigenina foi feita conforme as instruções do fabricante. Esta hibridização foi realizada a 60⁰C, durante 18 horas. A membrana foi posteriormente uma vez lavada com SSC 2X à temperatura ambiente durante 30 minutos e 2 vezes a 65⁰C durante 15 minutos. A revelação dos híbridos foi feita conforme as instruções do "Genius Nonradioactive DNA Labelling and Detection Kit" (18).

2.29. MAPEAMENTO DO TRANSCRITO CONTENDO O GENE nifA DE A. seropedicae

2.29.1. Purificação de RNA total de A. brasiliense

A. brasiliense estirpe FP10(pEMS107) foi crescido em meio NFbHPglu e NFbHPN e A. brasiliense FP10 em NFbHPglu. Destas culturas, somente a da estirpe FP10(pEMS107) crescida em NFbHPglu possuía atividade de nitrogenase. Treze mililitros de cada cultura foram rapidamente transferidos para um tubo de centrífuga de 50 ml de capacidade e lisados com 1,3 ml de solução de lise (Tris.HCl 0,5 M, EDTA 0,2 M, SDS 10%, pH 8,0). Após homogeneização por inversão, foi adicionado 1 volume de phenol/m-cresol/8-hidroxiquinoléina (1000:140:0,4) ao lisado, que foi incubado em banho de gelo durante 5 minutos. O lisado foi então centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4⁰C. A fase aquosa foi recolhida e

os ácidos nucleicos precipitados pela adição de 2,5 volumes de etanol absoluto. O precipitado contendo DNA e RNA foi lavado várias vezes com etanol 80% e seco à temperatura ambiente. Uma grande quantidade de sal co-precipitou com os ácidos nucleicos, possivelmente devido a alta concentração de fosfato no meio NFbHP. Este sal foi inicialmente removido por vários ciclos de precipitação com etanol (3 vezes), e então pela passagem por uma minicoluna de Sephadex G-25 como descrito na seção 2.26. Todos os reagentes e material de vidro ou plástico foram previamente esterilizados por autoclavação, para eliminar atividade de RNase.

2.29.2. Eletroforese de RNA em gel de agarose contendo formaldeído

A eletroforese de RNA foi feita conforme descrito pelo manual Amersham (3). O gel de agarose foi preparado adicionando a 1,1 g de agarose 73 ml de água bdestilada e 10 ml de tampão MOPS 10X (MOPS 0,2 M, acetato de potássio 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0) e autoclavado. Após a autoclavação o gel foi deixado para esfriar até aproximadamente 50⁰C, quando foram adicionados 17 ml de uma solução de formaldeído concentrada (37%). O gel foi finalmente despejado sobre a placa suporte de eletroforese montada com o pente. As amostras para eletroforese foram preparadas misturando-se a 6 µl de solução de RNA, 12,5 µl de formamida deionizada, 2,5 µl de tampão MOPS e 4 µl de formaldeído (37%), seguido de aquecimento a 65⁰C durante 5 minutos e rápido resfriamento em banho de gelo. Em seguida, 2,5 µl de glicerol 50%

contendo 0,1 mg/ml de azul de bromofenol foram adicionados a cada amostra. A eletroforese foi desenvolvida a 70 V durante 3-4 horas. As amostras de RNA das estirpes de *A. brasiliense* analisadas correspondia a aproximadamente 2 ml da cultura e as amostras de RNA padrão (Boehringer Mannheim Biochemicals) foram de 10 μ g.

2.29.3 Transferência do RNA para a membrana de nylon

Após o desenvolvimento da eletroforese a faixa de gel que continha o RNA padrão foi cortada longitudinalmente e corada com brometo de etídio (1 μ g/ml) durante 1 hora e descorada durante 12-20 horas com solução de β -mercaptoetanol 10 mM. O RNA foi então visualizado sob luz ultravioleta e o gel fotografado ao lado de uma régua. A parte do gel contendo as demais amostras não foi tratada com brometo de etídio, mas imediatamente utilizada para transferir o RNA para uma membrana de nylon ("Northern blotting"). Isto foi feito colocando-se o gel sobre uma fita de papel 3MM da exata largura do gel e então sobre uma plataforma de vidro, e o RNA foi transferido para a membrana de nylon por capilaridade como descrito para a transferência de DNA na seção 2.27. A transferência ocorreu durante 24 horas. Após secagem ao ar, membrana de nylon foi imediatamente levada ao transiluminador ultravioleta durante 5 minutos para fixação de ácido nucleico à membrana (3).

2.29.4. Hibridização DNA/RNA

O fragmento Bal II/Sal I de 0,4 kb foi isolado do plasmídeo pEMS300 por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e marcado com ^{32}P pelo método de síntese de DNA utilizando como primer uma mistura de hexadesoxinucleotídeo (2.24.2.). Este fragmento pertence a região interna do gene nifA de H. seropedicae. A hibridização foi realizada como descrito na seção 2.28.2. com as seguintes modificações: (a) a concentração de formamida foi de 50%; (b) na solução de hibridização ao invés de SSC 5X foi usado tampão SSPE 5X (SSPE 5X contém NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 900 mM, EDTA 5 mM, pH 7,7); e (c) a lavagem final foi feita com SSC 0,1X contendo SDS 0,1% durante 1 hora e repetida 3 vezes.

2.30. SUBCLONAGEM

Rotineiramente o fragmento purificado de DNA ou o plasmídeo digerido com enzima de restrição foi adicionado ao vetor linearizado com a mesma enzima de restrição, na proporção molar de 3:1 (inserto:vetor), e ligados (2.15.). A concentração final de DNA na mistura de ligação foi de 5-20 $\mu\text{g/ml}$. Quando as pontas do inserto ou do vetor não eram coesivas, foram tornadas cegas ("blunt") por tratamento com 0,5 mM de dNTP (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 0,5 unidades de enzima Klenow antes da adição de T4-DNA ligase.

2.31. CONSTRUÇÃO DE FUSÕES lacZ AO GENE nifA DE H.
seropedicae

A mutagênese com transposon foi feita como descrito por (23). O transposon Tn5-B21, integrado ao DNA do fago lambda, foi utilizado para a construção de fusões lacZ. O fragmento Hind III/Bam HI de 8,3 kb do plasmídeo pEMS101 foi purificado em gel de agarose de baixo ponto de fusão e subclonado no vetor pSUP202 digerido com Hind III/Bam HI. O plasmídeo resultante foi introduzido por transformação em E. coli S17.1 (su⁻).

E. coli S17.1 (pEMS108) foi crescida em meio TB (10g/l de triptona, 8 g/l de NaCl e 5 mg/l de tiamina), suplementado com 0,2% de maltose, durante 14-16 horas a 37⁰C e 150 rpm. As células foram então coletadas por centrifugação e ressuspensas em MgSO₄ 10 mM estéril (1/3 do volume da cultura). A cem microlitros desta suspensão de células foram adicionados 100 µl de uma suspensão de fagos λ Tn5-B21 (Tc^R) em meio SM e contendo aproximadamente 10¹⁰ fagos. A mistura foi incubada a 30⁰C durante 2 horas, plaqueada em meio LA contendo tetraciclina (10 µg/ml), carbenicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (30 µg/ml), e então incubada a 30⁰C por 2 dias. O fago λ mutante não pode se desenvolver na estirpe S17.1 (su⁻) mas a marca do transposon pode permanecer por recombinação com o genoma da bactéria, assim as colônias resistentes a Tc (marca do transposon) possuem o transposon inserido em algum local de

seu cromosoma ou no plasmídeo. Colônias de E. coli S17.1 simultaneamente resistentes a tetraciclina, carbenicilina e cloranfenicol foram isoladas e reunidas (aproximadamente 1000 recombinantes). Esta mistura de células foi utilizada para conjugação com E. coli DH5 (Nal^R). Os transconjugantes $Nal^R\ Tc^R\ Cm^R\ Amp^R$, isto é, aqueles que continham inserção do transponon no plasmídeo pEMS108, foram selecionados. Os plasmídeos de 96 transconjugantes foram digeridos com Hind III/Bam HI e analisados por eletroforese em gel de agarose. Aqueles que tinham o transponon Tn5 no inserto foram então mapeados com Sal I/Bam HI para localizar o ponto de inserção.

Outras fusões lacZ foram construídas com base no plasmídeo pEMS110 (nifA::lacZ). Os fragmentos Xba I/Pst I e Xba I/Nsi I do plasmídeo pEMS109, que continham o gene da β -galactosidase fundidos ao gene nifA de H. seropedicae e diferentes porções da região promotora, foram subclonados (2.30.) em pBR322 digerido com Pst I/Eco RI.

2.32. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A atividade de β -galactosidase foi determinada de acordo com Miller (183). As estirpes de E. coli hospedando plasmídeos com fusões nifA::lacZ foram crescidas em 4 mímelo mínimo contendo 200 μ g/ml de glutamina e suplementado com 20 mM de NH_4Cl (repressão) ou com 200 μ g/ml de serina (desrepressão), durante 18-20 horas. As culturas foram

feitas em frascos de 10 ml de capacidade, tapados com rolhas de borracha e submetidas a agitação (\approx 150 rpm) durante o desenvolvimento da cultura. Alíquotas de 100 μ l foram coletadas de cada cultura e adicionadas a 900 μ l de tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM, pH 7,0). A cada tubo foi então adicionado 100 μ l de SDS 0,1% e 100 μ l de clorofórmio e incubado a 30⁰C por 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 200 μ l de uma solução 4 mg/ml de o-nitrofenol- β -D-galactosídeo e, após 10 minutos de incubação a 30⁰C, foi interrompida pela adição de 0,5 ml de Na_2CO_3 1 M. A absorbância foi determinada a 420 nm e a 550 nm e a absorbância da cultura foi determinada a 600 nm. O cálculo da atividade foi feito utilizando a fórmula seguinte:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \times \frac{\text{D}0420 - 1,75 \times \text{D}0550}{t \times v \times \text{D}0600}$$

onde:

D0420 e D0550 são determinadas da mistura de reação,

D0600 é a absorbância da cultura a 600 nm,

t é o tempo de reação (10 minutos) e

v é o volume da cultura utilizado no ensaio (0,1 ml).

2.33. OBTENÇÃO DE DELEÇÕES PARA SEQUENCIAMENTO

O tamanho do fragmento de DNA que se consegue sequenciar com as 4 reações de sequenciamento seguidas de corrida eletroforética restringe-se a, no máximo, 400 pares de base. Devido a esta limitação, o sequenciamento de regiões maiores de DNA exige a subclonagem do fragmento a ser sequenciado. A sequência final é obtida pela sobreposição parcial das sequências destes subclones. Um método largamente utilizado é a deleção progressiva da região a ser sequenciada por ação de uma exonuclease, obtendo-se assim um conjunto de plasmídeos com insertos progressivamente deletados. Para o sequenciamento do gene nifA de H. seropedicae dois fragmentos (1,7 kb Eco RI e 2,0 kb Sal I) foram subclonados em vetores da série pTZ (175) e deletados com exonuclease III.

As deleções utilizando exonuclease III foram feitas nos insertos dos plasmídeos pEMS300, pEMS301, pEMS302 e pEMS303. Os plasmídeos (\approx 20 μ g) foram digeridos (2.13.) com Bam HI e depois com Kpn I (pEMS300 e pEMS301) e Pst I (pEMS302 e pEMS303). Estes plasmídeos, duplamente digeridos, foram extraídos com fenol:clorofórmio (24:1) e precipitados com etanol. O precipitado, depois de lavado com etanol 70% e seco, foi dissolvido em 40 μ l de água bidestilada e 5 μ l de tampão de exonuclease III 10X concentrado (Tris.HCl 660 mM, $MgCl_2$ 0,66 mM, pH 8,0), e pré-incubado a 37⁰C. A seguir, cinco μ l de exonuclease III (77 U/ μ l) foram adicionados em cada tubo rapidamente e, após 30 segundos, frações de 2,5 μ l

foram coletadas em tubos contendo 37,5 μ l de solução inativadora gelada (NaCl 0,2 M/EDTA 12 mM) em intervalos regulares de 20 segundos. Cada tubo contendo solução inativadora recebeu 5 frações coletadas em tempos sucessivos. A exonuclease III foi inativada a 70⁰C durante 10 minutos e o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 70% e seco a vácuo. Para eliminação das extremidades de fita simples o precipitado de cada tubo foi dissolvido em 50 μ l de uma mistura contendo tampão acetato de potássio 30 mM pH 4,6, NaCl 250 mM, ZnSO₄ 1 mM, 5% de glicerol e 70 unidades/ml de S1 nuclease, e incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. A nuclease S1 foi então inativada por extração com 25 μ l de fenol e com 25 μ l de clorofórmio e o DNA finalmente precipitado com 3 volumes de etanol absoluto. O precipitado depois de lavado com 200 μ l de etanol e seco foi dissolvido em 5 μ l de tampão Tris.HCl 50 mM pH 8,0 contendo MgCl₂ 10 mM, β -mercaptoetanol 1 mM, dNTP 0,5 mM e 10 unidades/ml de enzima Klenow, incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os plasmídeos deletados parcialmente foram recircularizados adicionando-se a cada tubo 2,5 μ l de tampão de ligação 10X concentrado (2.15.) e 17,5 μ l de água bidestilada, homogeneizados cuidadosamente, seguido da adição de 1 μ l de T4-DNA ligase (2 unidades). A mistura de ligação foi incubada a 16⁰C durante 18 horas e 5 μ l foram utilizados para transformar *E. coli* 71-18 (2.21.). Cerca de 50 colônias dos transformantes contendo deleções derivadas de cada plasmídeo foram analisadas por eletroforese em gel

de agarose, após digestão com as enzimas Sal I/Hind III (pEMS300 e pEMS301) e Eco RI/Hind III (pEMS302 e pEMS303).

2.34. PURIFICAÇÃO DE DNA DE FITA SIMPLES

A purificação de DNA de fita simples foi feita conforme descrito no manual da Pharmacia (211). Uma colônia de E. coli 71-18 contendo o plasmídeo derivado dos vetores pTZ foi inoculada em 2,5 ml de meio 2XTY e incubada a 37°C sob forte agitação (\approx 200 rpm), até D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,2-0,3 (\approx 2 horas). A cultura foi então infectada com 10^8 partículas do fago M13 mutante MK07 por 2 horas sob agitação e, em seguida 3 μ l de canamicina (20 mg/ml) foram adicionados para selecionar as células infectadas. A cultura foi então incubada a 37°C sob forte agitação (200 rpm) por 12 horas. Um mililitro desta cultura foi coletado em tubo plástico de 1,5 ml e centrifugado. Oitocentos microlitros do sobrenadante foram cuidadosamente transferidos para um tubo limpo contendo 200 μ l de solução NaCl/PEG (5 M NaCl, 20% PEG 8000). Após 15 minutos à temperatura ambiente, a preparação foi centrifugada por 10 minutos para precipitação das partículas virais. O sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente centrifugado por mais 3 minutos para completa eliminação do sobrenadante. O sedimento foi completamente ressuspenso em 100 μ l de T₁₀E₁ e os capsídeos foram rompidos pela adição de 100 μ l de fenol, seguido de incubação à temperatura ambiente por pelo menos 15 minutos e

agitação vigorosa em um agitador de tubos. Após centrifugação por 3 minutos a fase aquosa foi coletada e extraída uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi então precipitado com 2 volumes de etanol e lavado duas vezes com 0,5 ml de álcool 70%, seco à vácuo e dissolvido em 40 μ l de água bdestilada. Antes de utilizar qualquer preparação de DNA de fita simples para sequenciamento, uma amostra de 4 μ l foi eletroforisada em gel de agarose (1,1%) para verificar a integridade do DNA e o nível de contaminação com DNA de fago MK07.

2.35. SEQUENCIAMENTO

2.35.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Gel de poliacrilamida 7,5% foi utilizado para eletroforese das misturas de reação de sequenciamento (10). As placas suporte do gel eram de vidro com 6 mm de espessura, 40 cm de comprimento e 20 cm de largura. Para a formação dos poçinhos foram usados pentes tipo "dente de tubarão" (BRL), produzindo poçinhos de 4 ou 6 mm de largura.

Antes de preparar o gel, as placas foram cuidadosamente limpas com água bdestilada e detergente (Teepol), secas e desengorduradas com acetona e etanol. A placa menor foi siliconizada com 1 ml de solução 2% de dimetildiclorosilano em 1,1,1 tricloroetano. As duas placas foram montadas uma sobre a outra com os espaçadores (BRL) de 4 mm de espessura colocados lateralmente. As bordas foram seladas com fita

adesiva de vinil.

Para preparar 50 ml de gel foram misturados em uma proveta os seguintes reagentes:

23 g de uréia

7,5 ml de solução estoque de acrilamida 40%

5,0 ml de TBE 10X

água bdestilada para 50 ml

Após a completa dissolução da uréia por aquecimento a 37⁰C, foram rapidamente adicionados 300 μ l de uma solução recente de persulfato de amônio a 10% e 50 μ l de TEMED. Com o auxílio de uma seringa de 50 ml, a mistura foi derramada entre as placas seladas. Nesta operação as placas foram mantidas numa inclinação de cerca de 30⁰ e o fluxo não foi interrompido até o enchimento completo do espaço entre as placas. Após esta operação o conjunto foi colocado em mesa nivelada na posição horizontal e o pente foi posicionado adequadamente. As placas foram então deixadas em repouso por cerca de 2 horas para polimerização do gel.

A solução estoque de acrilamida (40%) continha:

Acrilamida	38 g
------------	------

Bisacrilamida (N,N'-metilbisacrilamida)	2 g
-----------------------------------------	-----

Água bdestilada q.s.p.	100 ml
------------------------	--------

Esta solução foi agitada com 5 g de amberilite MB1 durante 30 minutos. Após filtração em papel de filtro comum a solução foi filtrada por filtro Millipore de 0,45 μ m e mantida no escuro a 4⁰C.

2.35.2. Hibridização do "primer" ao DNA molde de fita simples

Cerca de 200 ng de DNA de fita simples (normalmente 1/20 de cada preparação ou 2 μ l) foram adicionados a 1 μ l de "primer" 5'-CAGGAAACAGCTATGAC (0,2 pmol), 1 μ l de tampão 10X (Tris.HCl 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM, pH 8,0) e água bidestilada até um volume final de 10 μ l. Esta mistura foi aquecida a 64°C durante 1 hora e, então deixada esfriar lentamente até a temperatura ambiente (10).

2.35.3. Reações de sequenciamento

Para cada clone 4 tipos de reações de sequenciamento são necessários. Em cada uma destas um dos 2',3'-didesoxinucleotídeos está presente juntamente com todos os quatro desoxinucleotídeos, sendo que um deste é marcado com um isótopo radioativo. Na presença de dNTP a enzima Klenow extende o "primer" utilizando o DNA simples fita como molde. Quando um didesoxinucleotídeo for incorporado, a cadeia não pode ser aumentada. Assim em cada uma das quatro reações contendo um ddNTP específico, que compete com o dNTP análogo, é sintetizada uma gama de moléculas parcialmente polimerizadas e terminadas em um ddNTP.

2.35.3.1. Preparo das misturas de desoxi/didesoxi-nucleotídeos

As misturas de dNTP/ddNTP utilizadas nas reações de sequenciamentos estão na tabela 2 (10).

TABELA 2. Misturas de dNTP/ddNTP utilizadas nas reações de sequenciamento

mistura dNTP	A	C	G	T
0,5 mM dTTP (μ l)	500	500	500	25
0,5 mM dCTP (μ l)	500	25	500	500
0,5 mM dGTP (μ l)	500	500	25	500
10,0 mM ddTTP (μ l)	-	-	-	50
10,0 mM ddCTP (μ l)	-	8	-	-
10,0 mM ddGTP (μ l)	-	-	16	-
10,0 mM ddATP (μ l)	1	-	-	-
$T_{10}E_{0,1}$ (μ l)	500	1000	1000	1000

3.35.3.2. Reações de sequenciamento e eletroforese

Quatro tubos de plástico de 1,5 ml foram marcados A, C, G e T e a cada um foram dispensados 2 μ l da correspondente mistura dNTP/ddNTP, preparada como descrito no item anterior. Após resfriamento da reação de hibridização (10 μ l) (2.35.2.) foram adicionados 1 μ l de enzima Klenow (1-2 U/ μ l) e 1,5 μ l de [α -³²S]dATP (>600 Ci/mmol, Amersham) seguido de homogeneização. Alíquotas desta mistura (2,5 μ l) foram adicionada rapidamente a cada um dos tubos A, C, G e T, que foram centrifugados por 5 segundos e incubados à

temperatura ambiente por 20-25 minutos. Em seguida, 2 μ l da mistura de preenchimento (0,5 mM de cada um dos dNTP) foram adicionados a cada um dos tubos para o alongamento das cadeias incompletas. Os tubos foram novamente centrifugados e incubados por mais 20 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa a mistura podia ser utilizada imediatamente para eletroforese ou estocada a -20 $^{\circ}$ C.

Antes de ser eletroforisada cada mistura de reação recebia 4 μ l de tampão de aplicação (EDTA 10 mM, xileno cianol 0,1% e azul de bromofenol 0,1% em formamida desionizada), era incubada durante 5-15 minutos a 90 $^{\circ}$ C e aplicada ao gel imediatamente para evitar renaturação do DNA. A eletroforese foi desenvolvida a potência constante (37 W), em aparelho vertical BRL (mod. S1). Cada conjunto de quatro reações foi submetido a uma corrida eletroforética curta (2 horas) e a uma corrida longa (4 horas), permitindo assim a determinação da sequência de até 350 pb.

Após a eletroforese, as placas foram removidas do aparelho, deixadas esfriar durante 20 minutos e então separadas com auxílio de uma espátula. O gel aderido à placa não siliconizada, foi suavemente imerso em uma solução de ácido acético (10%) e metanol (10%) e deixada por 30 minutos para a fixação do fragmentos de DNA marcados. Em seguida a placa contendo o gel foi retirada, o excesso de solução deixado escorrer e, após secar as bordas da placa com papel absorvente, o gel foi transferido para uma folha de papel 3MM e secado em secador de gel (Biorad) a 80 $^{\circ}$ C. A folha de papel 3MM contendo o gel seco foi autoradiografado durante

12-16 horas em filme Fuji RX.

As regiões que apresentaram compressão de bandas, principalmente aquelas de alto conteúdo (G + C), foram resolvidas utilizando 7-deaza-dGTP, ao invés de dGTP, nas misturas de dNTP/ddNTP e de preenchimento.

3.35.4. Leitura das autoradiografias

As sequências de bases foram lidas nas autoradiografias utilizando-se um digitador sônico e o programa Gelin (254). Os dados foram transferidos diretamente a um microcomputador BBC e estocados em disquetes (360 K), para análise posterior..

2.35.5. Edição e análise das sequências

Os dados primários foram transferidos para um computador VAX e, em seguida, alinhados por sobreposição das regiões idênticas utilizando o programa DBAuto (254). O alinhamento produzido pelo programa DBAuto foi diretamente estocado em arquivos produzidos pelo programa DButil (254) e então editados utilizando a rotina deste último programa.

Depois de resolvidas todos as dúvidas da sequência e completamente editada, a sequência foi analisada utilizando a rotina do programa Analyseq (255) e programas do "Wisconsin Package" (48). A determinação do produto de tradução, contagem de codons, percentagem de (G + C) nos codons, tabela de uso de codons foram feitas utilizando o programa Analyseq (255). A comparação de sequências de aminoácidos foi feita utilizando o programa Clustal (116).

A homologia entre sequências de aminoácidos foi calculada pela seguinte fórmula:

$$h = \frac{n \times A}{(N + N + \dots + N)} \times 100$$

onde h é a percentagem de homologia,

A é o número de resíduos idênticos entre as proteínas,

N é o número de resíduos de cada proteína e

n é o número de proteínas comparadas.

3. RESULTADOS

3.1. CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE H. seropedicae

Um banco de genes de Herbaspirillum seropedicae foi construído utilizando o cosmídeo vetor pVK102 (156), como descrito em Materiais e Métodos (figura 5). Um total de 533 colônias resistentes a canamicina foram isoladas após a infecção da cultura de Escherichia coli HB101. Destas colônias 466 foram sensíveis a tetraciclina e, portanto, possuíam inserto de DNA de H. seropedicae. A frequência de aparecimento de inserto, cerca de 87%, foi extremamente alta e pode ser atribuída a duas causas principais: a relação fragmento de DNA de H. seropedicae/DNA do vetor alta (3-4:1); e a alta estringência do método de empacotamento utilizado para o tamanho do DNA encapsulado (172). Os clones $Tc^S Km^R$ foram agrupados em sub-coleções de 50 clones cada e foram estocadas separadamente a -20^0C em suspensão contendo 50% de glicerol. Plasmídeos recombinantes isolados de alguns clones selecionados aleatoriamente foram analisados por eletroforese em gel de agarose intactos ou digeridos com a enzima Sal I (figura 6 e 7). A análise eletroforética de 26 clones $Tc^S Km^R$ mostrou que todos possuíam inserto com um tamanho médio de 26,4 kb. Assumindo que tamanho do genoma de H. seropedicae seja igual ao de Escherichia coli (cerca de 4.200 kb) (163) e um tamanho médio de inserto de 26,4 kb, a

aplicação da fórmula de Clarke e Carbon (42) mostrou que esta coleção de plasmídeos recombinantes representa cerca de 94% do genoma de *H. seropedicae*.

3.2. COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE nifA⁻ (FP10) DE A. brasiliense

O banco de genes foi conjugado "en masse" com o mutante FP10 nifA⁻ de A. brasiliense em um cruzamento triparental onde o plasmídeo pRK2013 foi utilizado como agente mobilizador (tabela 3). Os transconjugantes Nif⁺ de A. brasiliense FP10 foram selecionados em meio NFbHP sem nitrogênio fixado sob atmosfera de nitrogênio contendo 0,5-1% de oxigênio. Cerca de 100 microcolônias que se destacaram do crescimento de fundo foram coletadas em meio NFbHPN contendo canamicina (50 µg/ml) e ácido nalidíxico (10 µg/ml). Destas apenas 3 possuíam atividade de nitrogenase, determinada pela capacidade de reduzir acetileno em meio semi-sólido (tabela 4). Cada um destes transconjugantes, denominados FP10.9, FP10.29 e FP10.31, possuia plasmídeos recombinantes de mesmo peso molecular (figura 6). Os plasmídeos recombinantes nifA⁺ foram eliminados dos transconjugantes Nif⁺ pelo plasmídeo R68.45, do mesmo grupo de incompatibilidade (Inc. P1). Os transconjugantes FP10.9 (R68.45), FP10.29 (R68.45) e FP10.31 (R68.45) foram selecionados em meio NFbHPN contendo tetraciclina (10 µg/ml). Estes transconjugantes reverteram ao fenótipo Nif⁻ (tabela 4). A presença física dos plasmídeos nos diferentes

transconjugantes foi determinada por eletroforese em gel de agarose (figura 8 e 9).

3.3. ISOLAMENTO DO PLASMÍDEO pEMS1

O plasmídeo denominado pEMS1 foi isolado do transconjugante FP10.9 por lise alcalina e usado para transformar *E. coli* HB101. Um transformante HB101 (pEMS1) foi conjugado com o mutante FP10 e todos os transconjugantes FP10 (pEMS1) obtidos tiveram o fenótipo *Nif*⁺ restaurado (tabela 4).

3.4. MAPA DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEO pEMS1 E pEMS101

Mapa de restrição do plasmídeo pEMS1 foi determinado para as enzimas Sal I, Xba I e Bam HI (figura 10). Não foi encontrado sítio Hind III no inserto.

O plasmídeo pEMS101, derivado do pEMS1, foi mapeado com as enzimas Pst I, Bgl II, Cla I e Eco RI, e seu inserto não possui sítio para a enzima Kpn I (figura 10).

3.5. COMPLEMENTAÇÃO DE OUTROS MUTANTES nif DE *A. brasiliense* PELO PLASMÍDEO pEMS1.

O plasmídeo pEMS1 foi introduzido em vários outros mutantes Nif⁻ com o objetivo de identificar a presença de outros possíveis genes nif ou ntr. A tabela 5 mostra que o plasmídeo pEMS1 não foi capaz de complementar os mutantes FP9 e FP8 (ntrG⁻), ou os mutantes FP3 (nifHDK⁻) e FP6 (deficiente na produção de dinitrogenase redutase).

3.6. MAPEAMENTO DA REGIÃO nifa NO PLASMÍDEO pEMS1 POR SUBCLONAGEM

Com o objetivo de localizar a região nifa contida no plasmídeo pEMS1 vários subclones foram construídos e sua capacidade de complementar o mutante FP10 para fixação de nitrogênio foi testada (figura 11 e tabela 6). Os plasmídeos pEMS102, pEMS103 e pEMS104 que contém os fragmentos Sal I de 1,0 kb, 2,0 kb e 7,1 kb respectivamente não complementaram o mutante FP10. O plasmídeo pEMS105, obtido por hidrólise parcial com Sal I, que contém os fragmentos contíguos de 1,0 e 2,0 kb foi também incapaz de complementar o mutante (figura 11).

Uma nova construção foi então feita deletando o fragmento Bam HI de cerca de 21 kb do plasmídeo pEMS1. O plasmídeo resultante, pEMS101, foi capaz de complementar o mutante FP10, indicando que a região do gene nifa estava

compreendida entre os fragmentos Sal I de 7,1 kb e 2,0 kb adjacentes (figura 11 e tabela 6). Esta região foi posteriormente reduzida subclonando-se o fragmento Cla I de 5,2 kb no vetor pVK102, em ambas as orientações. Os plasmídeos resultantes pEMS106 e pEMS107 foram capazes de complementar o mutante FP10 para fixação de nitrogênio, confirmando que o gene nifA está localizado nos fragmentos Sal I de 7,1 e 2,0 kb (figura 11 e tabela 6).

3.7. MAPEAMENTO DA REGIÃO nifA NO PLASMÍDEO pEMS101 POR HIBRIDIZAÇÃO

A região do gene nifA contida no plasmídeo pEMS101 também foi localizada por hibridização com o gene nifA de *K. pneumoniae*. Três sondas radioativas diferentes foram usadas, todas extraídas do plasmídeo pMC71A (figura 12): a) O fragmento Sal I de 3 kb, contendo todo o gene nifA, parte do gene nifL (C-terminal) e parte do gene nifB (N-terminal); b) O fragmento Sal I/Sma I, contendo o mesmo que a prova A, mas uma região menor de nifB; e c) O fragmento Nru I, contendo 69 bp do C-terminal do gene nifL e praticamente todo o gene nifA. As sondas foram marcadas com $[\alpha-^{32}\text{P}]$ dGTP utilizando o método de extensão de hexadeonucleotídeos (81) e em condições de baixa estringência (35% de formamida, a 42⁰C). O padrão de restrição e os correspondentes autoradiogramas estão mostrados nas figuras 13, 14 e 15. O padrão de hibridização com as sondas A e B são idênticos. O fragmento

Sal I de 2,0 kb hibridiza fortemente com todas as sondas indicando que a maior porção do gene nifA de H. seropedicae está localizada neste fragmento. Por outro lado, a ausência do sinal sobre o fragmento Pst I de 1,8 kb e do fragmento Pst I/Bgl II de 1,7 kb com a sonda C, restringe a região do gene nifA ao fragmento Sal I/Pst I de 1,1 kb. A ausência de sinal nestes mesmos fragmentos e no fragmento Sal I de 1 kb com a prova C sugere ainda a presença dos genes nifB ou nifL adjacente ao gene nifA de H. seropedicae.

Possivelmente o gene nifA extende-se até o fragmento Eco RI de 1,7 kb, a se julgar pelo sinal de igual intensidade com as sondas B e C sobre os fragmentos Eco RI de 1,7 kb e Sal I de 5,5 kb. Estes resultados confirmam aqueles de complementação genética obtidos com os diferentes subclones.

3.8. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE nifA NO GENOMA DE H. seropedicae

Para verificar se fragmentos do plasmídeo pEMS101 homólogos ao gene nifA de K. pneumoniae estavam presentes no genoma de H. seropedicae, seu DNA total foi isolado, digerido com Sal I ou Eco RI e hibridizado com uma sonda específica para o gene nifA de K. pneumoniae sob condições de baixa estringência (35% formamida, a 42⁰C). Esta sonda consistiu do fragmento Nru I de 1,4 kb do plasmídeo pMC71A, que contém o gene nifA de K. pneumoniae, marcado com

$[\alpha-^{32}\text{P}]$ dCTP. A autoradiografia na figura 16 mostra que um fragmento Sal I de 2,0 kb e um fragmento Eco RI de 0,7 kb hibridizam com esta sonda. Estes fragmentos provavelmente correspondem aos fragmentos Sal I de 2,0 kb e Eco RI de 0,7 kb do plasmídeo pEMS101 e que hibridizam fortemente com o gene nifA de K. pneumoniae (figuras 13, 14 e 15). Entretanto, várias porções do DNA de H. seropedicae hibridizaram com o gene nifA de K. pneumoniae, nestas condições de baixa estringência.

3.9. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES nifHDK NO PLASMÍDEO pEMS1 E NO GENOMA DE H. seropedicae

O fragmento Eco RI de 4,1 kb do plasmídeo pCQ12, que contém os genes nifHDK de R. phaseoli, foi marcado com dUTP-digoxigenina e hibridizado com pEMS1 e com DNA genômico de H. seropedicae, ambos digeridos com Eco RI. Embora hibridização com DNA genômico tivesse produzido sinais nas bandas Eco RI de 7,1 kb e de 1,2 kb (figura 17), nenhum sinal pode ser visto com o plasmídeo pEMS1 em condições de alta ou baixa estringência. Estes resultados identificam a presença de genes homólogos aos gene nifHDK no genoma de H. seropedicae e sua ausência no plasmídeo pEMS1.

3.10. OBTENÇÃO DE DELEÇÕES PARA O SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CONTENDO O GENE nfa DE H. seropedicae.

Os subclones para sequenciamento e as deleções foram construídas em vetores da série pTZ (175). Estes vetores são plasmídeos derivados de pUC18 e pUC19 e, portanto, possuem a região de múltiplos sítios de restrição ("polylinker") desses plasmídeos bem como a facilidade de reconhecimento da presença de inserto pela inativação do gene da β -galactosidase. Os vetores pTZ possuem ainda um promotor de bacteriófago T7 na a extremidade do "polylinker" e a origem de replicação do fago M13. Esta última característica permite a replicação dos plasmídeos pTZ como DNA de fita simples e sua encapsulação quando seu hospedeiro (E. coli F') for co-infectado com um fago M13 (175).

O fragmento Sal I de 2,0 kb foi clonado em ambas orientações no vetor pTZ18R (175), produzindo pEMS300 e pEMS301, enquanto que o fragmento Eco RI de 1,7 kb foi clonado também em ambas orientações no vetor pTZ19R, produzindo pEMS302 e pEMS303. Os plasmídeos pEMS300, pEMS301, pEMS302 e pEMS303 foram digeridos com Bam HI, produzindo pontas 5' protundentes. A seguir os dois primeiros foram digeridos com Kpn I e os dois últimos com Pst I produzindo em ambos os casos pontas 3' protundentes adjacentes ao vetor. A enzima exonuclease III não é capaz de atacar pontas 3' protundentes. A presença de uma ponta 3' protundente evita que o vetor seja digerido pela exonuclease III. Após a digestão com Exonuclease III por diferentes

tempos, a fita simples foi digerida com nuclease S1, seguido do preenchimento das pontas com dNTP e enzima Klenow e, finalmente, re-ligadas. Um quinto de cada mistura das reações de ligação foi utilizado para transformar *E. coli* 71-18, produzindo cerca de 50-300 colônias por placa. Os padrões de plasmídeos de cerca de 20 colônias para cada tempo foram analisados por eletroforese em gel de agarose após digestão com a combinação de enzimas de restrição adequada (Hind III/Sal I ou Hind III/Sac I para os plasmídeos pEMS300 e pEMS301, e Hind III/Eco RI, para os plasmídeos pEMS302 e pEMS303). Os novos clones foram agrupados segundo seus tamanhos, totalizando 48 plasmídeos. Destes 14 foram derivados do plasmídeo pEMS300, 15 do pEMS301, 10 do pEMS302 e 9 do pEMS303. Um exemplo do padrão de deleções obtidas é mostrado na figura 18. O DNA de fita simples do clone pEMS301 e suas deleções mostrado na figura 19 foi isolado de *E. coli* 71-18 co-infectada com o fago M13 MK07.

3.11. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CONTENDO O GENE nla DE *H. seropedicae*

O conjunto de deleções obtido foi ordenado por tamanho e cada clone diferiu entre si por aproximadamente 100-200 pb. Todos os clones do conjunto de deleções de cada plasmídeo foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia com didesoxinucleotídeos (10) como descrito em

Materials e Métodos.

Sequências de aproximadamente 250-300 nucleotídeos foram determinadas para cada deleção. Estas sequências individuais foram alinhadas e editadas em computador VAX utilizando-se os programas DBAuto e Dbutil (254), respectivamente. Cada base foi lida em média mais do que três vezes em diferentes corridas (figura 20 e adendo 1).

Este procedimento permitiu a determinação da sequência completa dos fragmentos Sal I e Eco RI em ambas as direções (figura 20). A sequência da região que une os fragmentos Sal I e Eco RI foi determinada utilizando dois outros clones: o fragmento Sal I de 5,5 kb clonado no vetor pTZ18R e o fragmento Eco RI de 0,7 kb clonado no vetor pTZ19R, produzindo os plasmídeos pEMS304 e pEMS305, respectivamente. O plasmídeo pEMS304 foi sequenciado a partir do sítio Sal I em direção ao sítio Eco RI, até sobreposição de cerca de 20 pb, enquanto que o plasmídeo pEMS305 foi sequenciado na direção oposta até se sobrepor ao fragmento Sal I, previamente sequenciado. A sequência completa após edição continha 4.037 nucleotídeos (figura 21).

A análise desta sequência final usando os métodos de posicionamento das bases e de Shepherd do programa Analyseq (255) indicou a presença de três ORF potenciais: uma ORF completa, localizada região central da porção sequenciada, flanqueada por duas ORF parciais (figuras 22 e 23). Resultados semelhantes foram obtidos quando se empregou o método de preferência de codons (programa Analyseq), utilizando uma tabela de uso preferencial de codons obtida

dos prováveis produtos de tradução dos genes nifA e nifB de *H. seropedicae* (figuras 24).

Estudos de hibridização e de complementação genética indicavam que a ORF completa correspondia a do gene nifA de *H. seropedicae*. Esta ORF comprehende 1629 nucleotídeos, contém apenas um codon de iniciação (AUG) em fase de leitura na posição 1526, terminando na posição 3154 e codificando para uma proteína com 542 resíduos de aminoácido (P.M. 60.880). Uma sequência heptamérica que concorda bem com uma sequência Shine-Dalgarno (245), sítio de ligação no ribosomo, foi encontrada a 4 pares de base do codon de inicio de tradução (figura 21).

A sequência de aminoácidos deduzida para a provável proteína NifA de *H. seropedicae* a partir da sequência de nucleotídeos foi comparada às sequências de aminoácidos das proteínas NifA de *K. pneumoniae* (36,60), *Rhizobium meliloti* (36), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (102) e *Azorhizobium caulinodans* (192) (figura 25). O alinhamento das proteínas, seguindo o critério de homologia e similaridade de aminoácido foi feito em um microcomputador PC-AT utilizando o programa Clustal (116). A homologia global encontrada entre as cinco proteínas foi de 23%, mas as diferentes proteínas apresentaram regiões claramente conservadas e outras onde o nível de homologia não foi significativo (figura 25).

A homologia compartilhada na porção N-terminal (domínio A e C) entre as cinco proteínas NifA é muito baixa: somente 10 resíduos de aminoácido estão posicionados corretamente,

desde que se proceda a introdução de falhas na sequência polipeptídica (figura 25). No domínio central (domínio D), entretanto, o grau de conservação dos resíduos de aminoácido é bastante extenso (figura 26 e tabela 7). Uma similaridade de 48% foi encontrada entre todas as cinco proteínas NifA e 57% quando a proteína NifA de *H. seropedicae* foi comparada com as proteínas NifA de *Rhizobium* spp. e de *A. caulinodans*. Este grau de homologia é particularmente alto em duas regiões do domínio D, postuladas como sítios de ligação de ATP (192). Nestas regiões praticamente todos os aminoácidos são exatamente conservados em todas as proteínas NifA comparadas (figura 26).

A região C-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* também exibe extensa homologia com as outras proteínas comparadas (figuras 25 e 27). Cerca de 45% dos resíduos de aminoácidos deste domínio são conservados nas proteínas comparadas e o nível de homologia neste domínio é novamente maior quando se compara a proteína NifA de *H. seropedicae* com as de organismos simbóticos do que com a de *K. pneumoniae* (tabela 7). Esta região apresenta um motivo α -hélice-volta- α -hélice (H-V-H), presumivelmente o sítio de interação da proteína NifA com o DNA. Na posição 9 do motivo H-V-H do gene *nifA* de *H. seropedicae* encontra-se um resíduo de asparagina substituindo o resíduo de glicina (figura 27). Convém observar que este resíduo de glicina é altamente conservado nesta posição do motivo H-V-H de proteínas que se ligam ao DNA (60,201).

Finalmente, a proteína NifA de *H. seropedicae* contém

também um interdomínio (figura 28), localizado entre os domínio D e E, similar àqueles presentes nas proteínas NifA de espécies de Rhizobium spp., Bradyrhizobium japonicum (86), A. caulinodans (192) e Rhodobacter capsulatus (173) mas que está ausente das proteínas NifA de K. pneumoniae (36,60) e de Azotobacter vinelandii (12). Em H. seropedicae, este interdomínio é mais curto que aqueles das proteínas NifA de Rhizobium spp. e Bradyrhizobium japonicum, mas contém os dois resíduos de cisteínas, que também são conservados nestas espécies. Além disto, várias substituições conservativas ocorrem nesta região. Os resíduos de cisteínas presentes neste interdomínio, bem como os dois outros resíduos de cisteínas localizados no final do domínio D, essencialmente conservados nas proteínas NifA das espécies que apresentam o interdomínio, podem ser relevantes para a função da proteína NifA (86).

3.12. SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS DO GENE nifA

A região promotora do gene nifA de H. seropedicae contém novas características regulatórias. Precedendo em cerca de 110 pb o codon de início de tradução três possíveis promotores -24/-12 foram identificados: GGGCATGAAGTTGCT, na posição 1365; CGCGCTTTCTGCT, na posição 1412; e CGGTAATTACACGGCG, na posição 1401 (figuras 21 e 29). A primeira destas sequências (posição 1365) exibe uma boa concordância com a sequência consenso (figura 21 e 29). Além

destas sequências, a 257 pb do início de tradução foi encontrada uma sequência que apresenta alta concordância com a sequência de ligação da proteína NifA (TGTCGTAAATCCGACA, na posição 1256) (figuras 21 e 29). Além disto, a cerca de 400 bp acima do início de tradução do gene nifA foi identificado uma outra sequência em boa concordância com a sequência consenso de promotor -24/-12 (GGGCTACCGGCTTGT, na posição 1106). E mais, 100 pb antes desta sequência está localizado um sítio de ligação para a proteína NtrC (GCACGGCAGGTGGTGCAC, na posição 1007) (figura 21 e 29).

Duas novas sequências com potencial para participarem na regulação da expressão do gene nifA de H. seropedicae foram ainda identificadas. Em primeiro lugar, uma possível sequência "anaerobox" foi identificada na posição 2288 (TTGATCAAGGTCAA), localizada portanto após do sítio de início de tradução. Esta estrutura apresenta duas substituições em relação à sequência consenso (192) TTGATNNNNATCAA (figura 30).

Em segundo lugar, precedendo em 49 pb o sítio de ligação para a proteína NifA no promotor do gene nifA de H. seropedicae, foi encontrada a sequência AATCAATGGGATA (posição 1205) (figura 30), que difere em apenas um nucleotídeo da sequência consenso do fator de integração do hospedeiro (IHF) WATCAANNNNTTR, onde W = A,T; R = A ou G (41).

3.13. A SEQUÊNCIA DO GENE nifB de H. seropedicae

A cerca de 300 bp da porção C-terminal do gene nifA, a região N-terminal de uma outra ORF foi identificada. Uma sequência pentamérica, predita como sítio de ligação ao ribosomo, sequência Shine-Dalgarno (245), precede em sete nucleotídeos o suposto codon de início de tradução (AUG, na posição 1515) (figura 21). A sequência de aminoácidos deduzida da sequência de nucleotídeos desta região compreende os primeiros 163 aminoácidos da proteína, iniciando na posição 3547. A presença do gene nifB ou nifL nesta região do plasmídeo pEMS101 já havia sido indicada pelos estudos de hibridização (figura 13, 14 e 15). A comparação desta sequência parcial de aminoácidos com a sequência da proteína NifB de B. japonicum (196) e A. vinelandii (141) mostrou uma extensa homologia (figura 31). Cerca de 68% e 66% dos resíduos de aminoácidos da porção N-terminal da proteína NifB de H. seropedicae são idênticos aqueles da mesma região de NifB de B. japonicum e A. vinelandii, respectivamente. Entretanto o grau de homologia cai para 57% quando comparada com a região N-terminal da proteína NifB de K. pneumoniae. Um grupo de resíduos de cisteína (cys-X₃-cys-X₂-cys-X₅-cys), característico de proteínas NifB e muito semelhante aos grupos de cisteína presentes em proteínas que ligam metal (35), foi identificado entre os resíduos 80 e 94. Aproximadamente 90% dos 20 resíduos de aminoácidos situados de cada lado deste

grupamento são identicamente conservados em todas as três proteínas (figura 31). Estes resultados indicam que esta ORF contígua ao gene nifA corresponde ao gene nifB de H. seropedicae.

A análise da região promotora do gene nifB de H. seropedicae revelou estruturas características de genes nif encontradas em outros organismos. Um promotor -24/-12 (TGGCACGGTTTGGCT, na posição 3482) está localizado a 50 pb do sítio de início de tradução. Além disto, foram identificados dois sítios de ligação para a proteína NifA, precedendo em 55 bp (TGICGTGTTCATGACA, na posição 3370) e 97 bp (TGICGCTATCCTCACCA, na posição 3411) o promotor -24/-12 (figura 29).

3.14. IDENTIFICAÇÃO DE UMA ORF POTENCIAL PRECEDENDO O GENE nifA

Uma outra possível ORF foi identificada precedendo os genes nifA e nifB. Vários métodos de identificação de região codificadora sugerem que essa região provavelmente codifica para uma proteína (figuras 22, 23 e 24). O método de uso preferencial de codons, utilizando uma tabela de codons obtida a partir dos genes nifA e nifB de H. seropedicae, sugere que essa nova ORF seja transcrita em sentido oposto ao dos dois primeiros genes. Além disto, a percentagem de (G + C) nas posições 1, 2 e 3 dos codons do possível transcrito é bastante similar àquela dos genes nifA e nifB ou àquela

calculada (tabela 10). A sequência de aminoácidos parcial obtida a partir dessa ORF potencial não apresenta alta homologia com a proteína NifF de *K. pneumoniae* ou *A. vinelandii*. A comparação dos produtos de tradução desta região nas seis fases de leitura com o banco de dados de sequências não revelou nenhuma proteína com grau significativo de homologia.

3.15. CONSTRUÇÃO DE FUSÕES nifA::lacZ

Fusões de promotores com o gene da β -galactosidase constituem um meio fácil e cômodo de estudo da regulação da expressão gênica. Isto ocorre principalmente porque a β -galactosidase é uma enzima estável e sua atividade pode ser facilmente determinada. Além disto, uma gama de vetores tem sido engendrados, permitindo a construção de fusões traducionais nas três fases de leitura usando diversas enzimas de restrição. Recentemente foram construídos transposons baseados no Tn5 que permitem a construção de fusões lacZ transpcionais por recombinação "in vivo" (247). O transponon Tn5-B21 (figura 32) contém o gene da β -galactosidase, sem seu promotor, precedido de um sítio de ligação em ribossomo e sinal de parada de tradução nas três fases de leitura (247). Assim a inserção deste transponon na região codificadora de um gene qualquer e na orientação correta permite que a transcrição do gene lacZ seja controlada pelo promotor daquele gene (247).

O fragmento Hind III/Bam HI de 8,3 kb foi isolado do plasmídeo pEMS101 e clonado no vetor pSUP202 (246) digerido com Hind III/Bam HI. O plasmídeo resultante, pEMS108, foi transferido para E. coli S-17.1 e mutagenizado com λ ::Tn₅-B21 como descrito em Material e Métodos. Noventa e seis plasmídeos recombinantes pEMS108::Tn₅-B21 foram isolados e mapeados para a determinação do ponto de inserção do transpon. Dois destes plasmídeos, pEMS109 e pEMS110, continham o transpon Tn₅-B21 inseridos no gene nifA e no gene nifB, respectivamente, e na direção de transcrição destes genes (figura 33). O ponto de inserção e a direção do transpon foram determinados por eletroforese em gel de agarose após digestão com Sal I/Bam HI e com Hind III/Bam H. O plasmídeo pEMS109 foi utilizado para estudos de regulação da expressão do gene nifA.

A partir desta fusão inicial duas outras construções foram feitas utilizando como vetor o plasmídeo pBR322. O plasmídeo pEMS109 foi digerido com as enzimas de restrição Pst I/Xba I e um fragmento de aproximadamente 6,5 kb foi purificado em gel de agarose de baixo ponto de fusão. Este fragmento, que continha o gene da β -galactosidase inserido na região codificadora do gene nifA e toda a sua região regulatória, foi clonado no plasmídeo pBR322 digerido com Eco RI/Pst I. O plasmídeo resultante (pEMS111) foi digerido com Nsi I/Pst I e, a seguir, as pontas ligadas e a mistura de reação usada para transformar E. coli MC1061, produzindo o plasmídeo pEMS112 (figura 34). O plasmídeo pEMS112 não possui o promotor -24/-12 ativado por NtrC e nem o sítio de

ligaçāo para a proteína NifA. Nestes dois plasmídeos derivados a fusão nifA::lacZ é transcrita em sentido contrário ao do gene de resistência à ampicilina do vetor pBR322, evitando assim uma possível interferência do promotor deste gene sobre a expressão do gene nifA de H. seropedicae. As diversas fusões nifA::lacZ construídas estão relacionadas na tabela 8.

3.16. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE nifA DE H. seropedicae

O plasmídeo pEMS109 (HsnifA::lacZ) foi introduzido por transformação nas seguintes estirpes de E. coli: ET8000 (selvagem), ET8045 (rpoN⁻) e ET8556 (ntrC⁻). Os transformantes contendo o plasmídeo pEMS109 foram crescidas (18-20 horas) em meio mínimo suplementado com 20 mM de NH₄Cl ou 200 µg/ml de serina como fonte de nitrogênio repressora e não repressora, respectivamente, e ensaiados para a atividade de β-galactosidase (tabela 9). Em condições não repressoras os níveis de β-galactosidase na estirpe ntrC⁺ (ET8000) foram 4 vezes superiores àqueles em condições repressoras, enquanto nas estirpes ntrC⁻ (ET8556) e rpoN⁻ (8045) os níveis foram semelhantes nas duas condições (tabela 9). A presença do plasmídeo pMM14 (ntrC^C de K. pneumoniae) provoca um aumento dos níveis de β-galactosidase nas estirpes selvagem e ntrC⁻, mas não na estirpe rpoN⁻. Estes resultados indicam que, em E. coli, a expressão do gene nifA de H. seropedicae requer o produto do gene rpoN e

é ativada, embora fracamente, por NtrC.

Os plasmídeos pEMS111 e pEMS112 também foram utilizados para estudar a regulação da expressão do gene nifA de H. seropedicae. Estes plasmídeos foram introduzidos em E. coli ET8000 e ET8556 e a atividade de β -galactosidase determinada em condições de repressão e não repressão. Os resultados mostrados na tabela 9 evidenciam novamente a importância do produto do gene ntrC para a expressão do gene nifA de H. seropedicae, uma vez que o plasmídeo pEMS112, que não possui o sítio de ligação para NtrC, não é ativado na estirpe ntrC⁺. Por outro lado, a expressão do gene nifA parece insensível ao produto do gene nifA de K. pneumoniae, produzido constitutivamente a partir do promotor tet do plasmídeo pMC71A (tabela 9).

3.17. MAPEAMENTO DE TRANSCRITOS CONTENDO O GENE nifA DE H. seropedicae

O mapeamento de transcritos contendo sequências do gene nifA foi feito por hibridização DNA/RNA. Um fragmento interno do gene nifA de H. seropedicae, o fragmento Sal I/Bgl II de 0,4 kb do plasmídeo pEMS300, foi hibridizado com RNA total de A. brasiliense estirpe FP10 e A. brasiliense estirpe FP10 (pEMS107). Estas estirpes foram crescidas em condições de desrepressão e de repressão para a nitrogenase. Um sinal radiográfico correspondente a um transcrito de 1,8 kb foi identificado na amostra de RNA da estirpe FP10

(pEMS107) em condição de desrepressão, mas não na de FP10 em condição de desrepressão ou FP10(pEMS107) em condição de repressão (figura 35). Este dado, embora preliminar, sugere que o gene nifA de H. seropedicae seja monocistrônico e transcrito a partir de seu próprio promotor.

3.18. CONTEÚDO (G +C) DA REGIÃO SEQUENCIADA DO GENOMA DE H. seropedicae

O conteúdo (G + C) da região sequenciada foi de 60%. Este valor está próximo, mas é inferior, ao conteúdo (G + C) relatado para o genoma total de H. seropedicae que foi estimado em 67% (7).

A frequência de utilização (G + C) na primeira, segunda e terceira posição do codon foi calculada (tabela 10) a partir do prováveis produtos de tradução dos genes nifA e nifB. O conteúdo (G + C) na terceira posição dos codons utilizados nos genes nifA e nifB de H. seropedicae é alto (74%), porém não tão altos como aqueles reportados para A. brasiliense (19), e reflete o seu conteúdo (G +C) global, sendo ligeiramente superior aqueles esperados (14).

3.19. USO DE CODONS NOS GENES nifA E nifB DE H. seropedicae

A preferência de uso de codon de H. seropedicae calculada a partir das sequências dos genes nifA e nifB (705

codons) é bastante diferente daquela de E. coli (tabela 11). Diferenças significativas ocorrem também no uso de codons nos genes nifA e nifB de H. seropedicae e o uso de codons de A. brasiliense (tabela 11).

FIGURA 5 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO BANCO DE GENES DE *H. seropedicae*

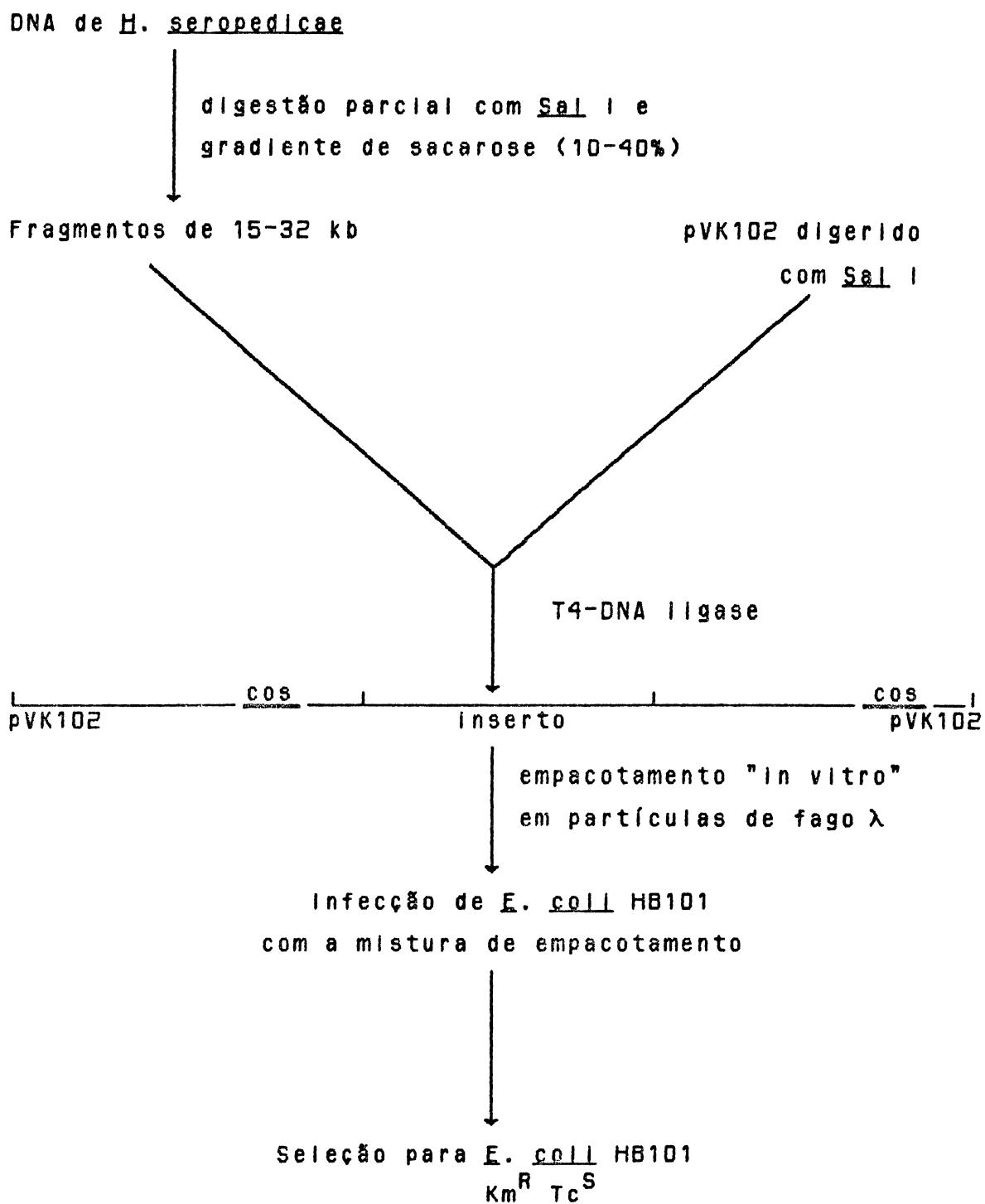
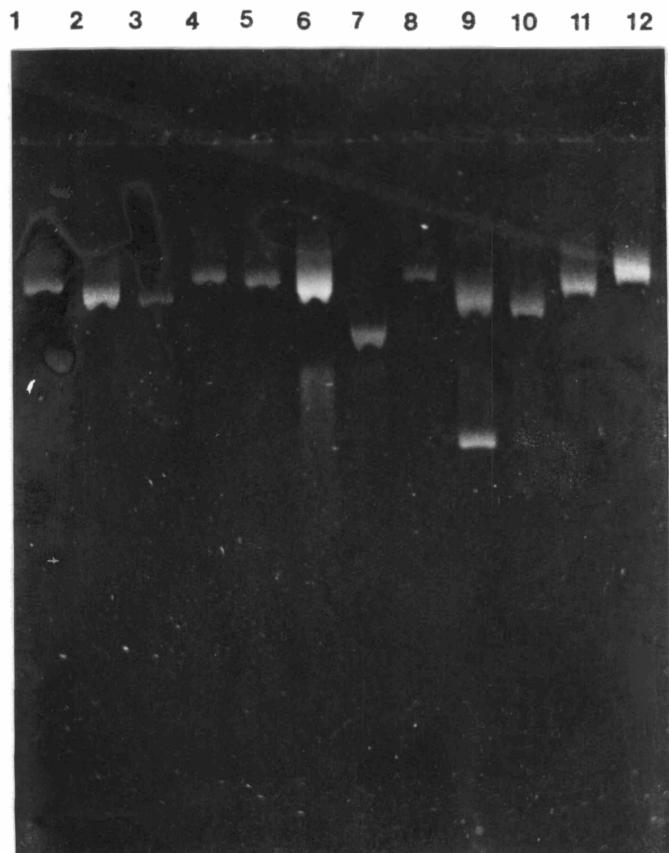


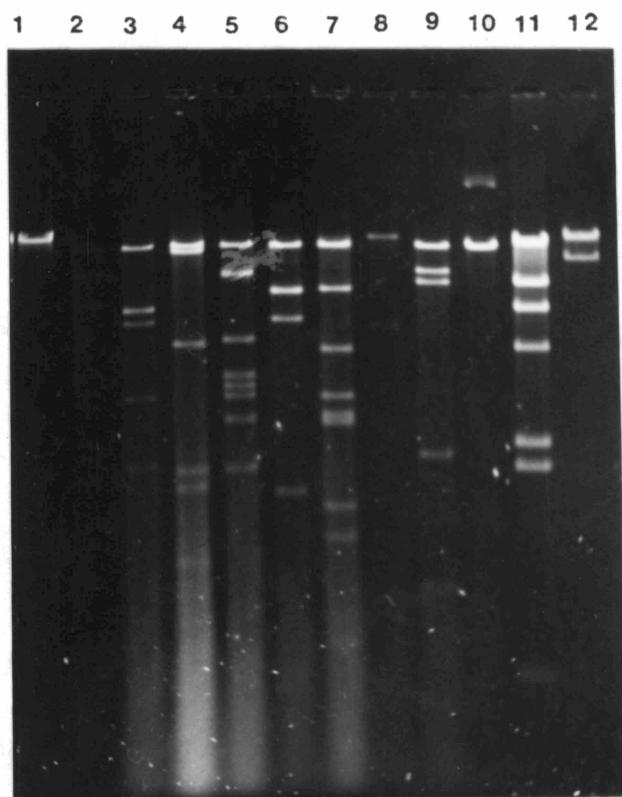
FIGURA 6 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES DO BANCO DE GENES
DE *H. seropedicae*



Os plasmídeos de alguns clones do banco de genes foram isolados (2.11.2.1.) e eletroforisados em gel de agarose 0,7% (2.9.).

- 1-8 pVK102::HsDNA
- 9 pVK102 (23 kb)
- 10 pAB441 (43 kb)
- 11 pRK2013 (48 kb)
- 12 R68.45 (60 kb)

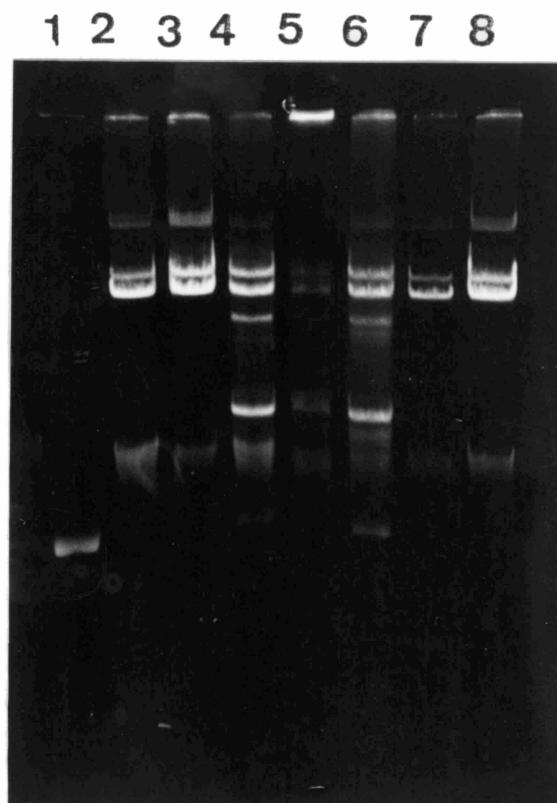
FIGURA 7 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES DO BANCO DE GENES
DE *H. seropedicae* DIGERIDOS COM Sal I



Os plasmídeos de alguns clones do banco de genes foram isolados (2.11.2.1.), digeridos com Sal I e eletroforisados em gel de agarose 0,7% (2.9.).

- 1 DNA do fago lambda intacto
- 2-9 pVK102::HsDNA digerido com Sal I
- 10 pVK102 digerido com Sal I
- 11 DNA do fago λ digerido com Hind III
- 12 DNA do fago λ digerido com Sal I

FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTES DE *A. brasiliense* FP10 NIF⁺



Os plasmídeos foram isolados como descrito em Materiais e Métodos (2.11.2.2.), e eletroforisados em gel de agarose 0,7% (2.9.).

- 1 pVK102
- 2 FP2
- 3 FP10
- 4 FP10.9
- 5 FP10.29
- 6 FP10.31
- 7 FP10
- 8 FP2

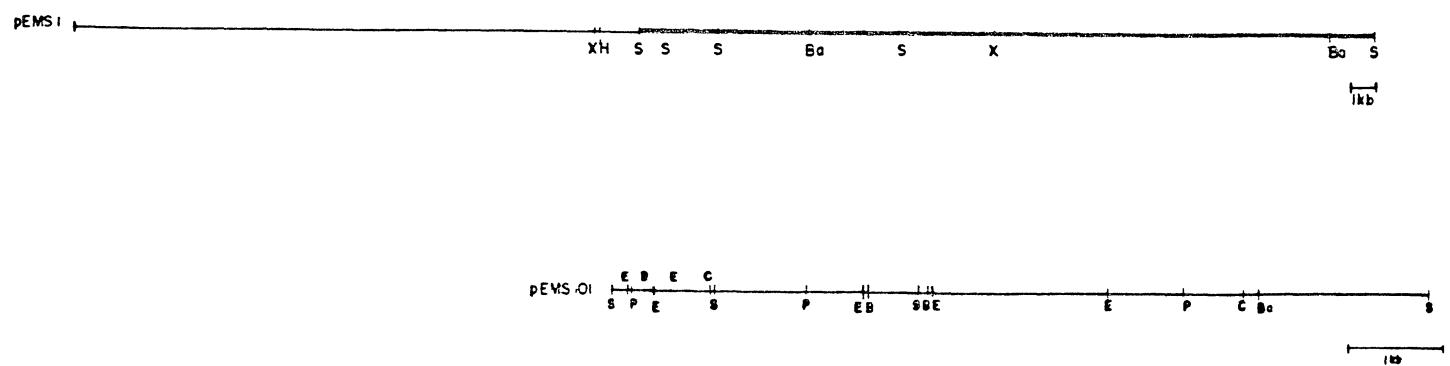
FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTES FP10.9
E FP10.9(R68.45)



Os plasmídeos foram isolados como descrito em Materiais e Métodos (2.11.2.2.) e eletroforisados em gel de agarose 0,7% (2.9.).

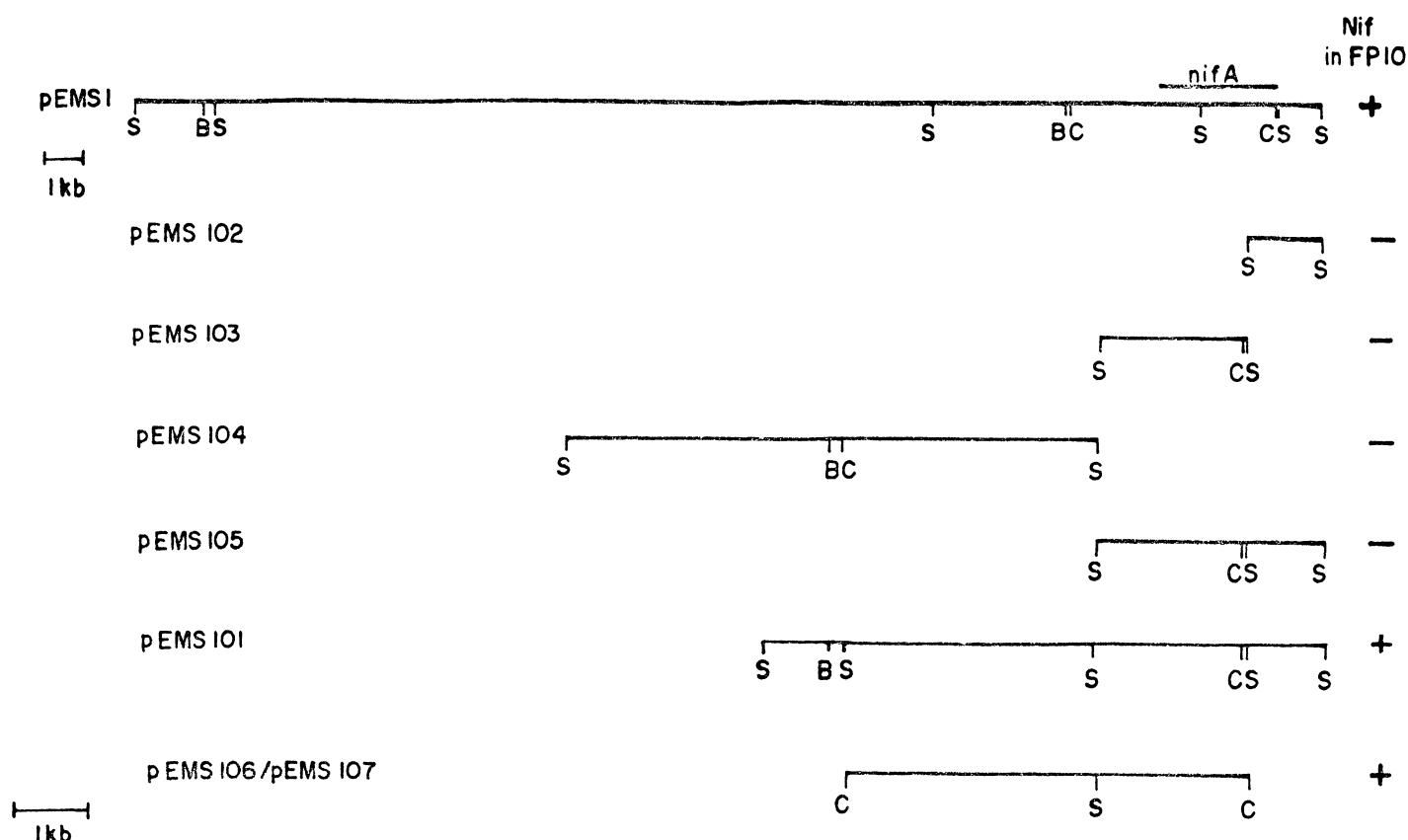
- 1- FP10
- 2- FP10.9
- 3- FP10.9(R68.45)
- 4- R68.45
- 5- pVK102

FIGURA 10 - MAPA DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS pEMS1 E pEMS101



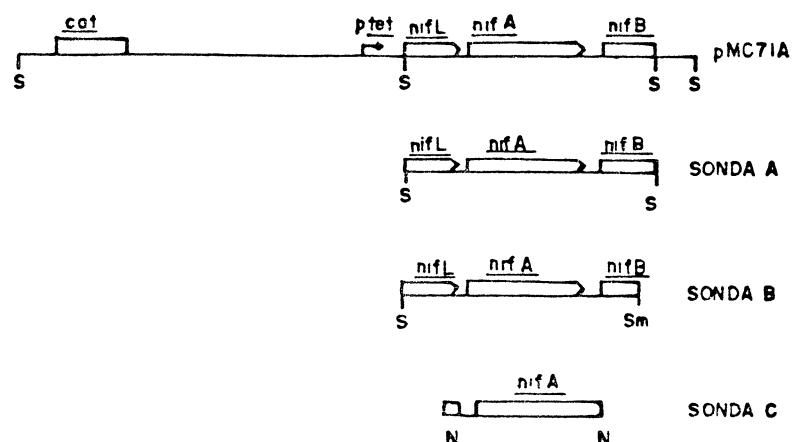
Os mapas de restrição dos plasmídeos pEMS1 e pEMS101 foram elaborados como descrito em Materiais e Métodos (2.22.). O plasmídeo pEMS101 foi construído a partir do pEMS1 pela deleção do fragmento Bam HI (indicada pelas linhas pontilhadas). As enzimas de restrição indicadas são: Ba, Bam HI; B, Bgl II; C, Cla I; E, Eco RI; H, Hind III; P, Pst I; S, Sal I e X, Xba I. Não foi encontrado sítio para a enzima Hind III no inserto do plasmídeo pEMS1 ou sítio para a enzima Kpn I no inserto do plasmídeo pEMS101.

FIGURA 11 - PLASMÍDEOS DERIVADOS DO PLASMÍDEO pEMS1



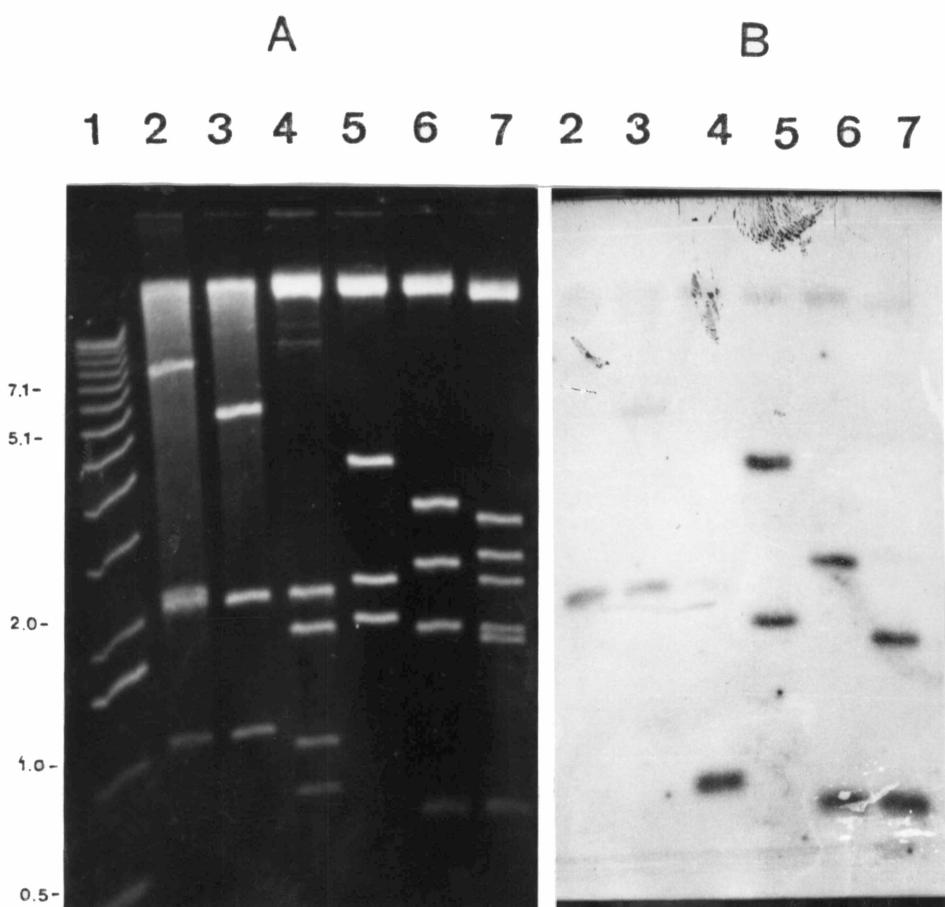
Os plasmídeos pEMS102, pEMS103 e pEMS104 foram construídos digerindo o plasmídeo pEMS1 com Sal I seguido de ligação e transformação em *E. coli* DH5. O plasmídeo pEMS105 foi obtido por hidrólise parcial do pEMS1 com Sal I e, novamente tratamento com T4-DNA ligase e transformação em *E. coli* DH5. O plasmídeo pEMS101 é derivado do pEMS1 por deleção do fragmento interno Bam HI de 21 kb e os plasmídeos pEMS106 e pEMS107 foram construídos ligando o fragmento Cla I de 5,2 kb do pEMS101 no sítio Sla I do pVK102. O vetor de todos as construções é o plasmídeo pVK102. B, Bam HI; C, Cla I e Sal I.

FIGURA 12 - ESQUEMA DOS FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO O GENE nifA DE K. pneumoniae UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO



Os fragmentos de DNA foram obtidos do plasmídeo pMC71A. As enzimas de restrição são: S, Sal I; Sm, Sma I e N, Nru I.

FIGURA 13 - HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pEMS1 E pEMS101 COM O FRAGMENTO Sal I DO PLASMÍDEO pMC71A



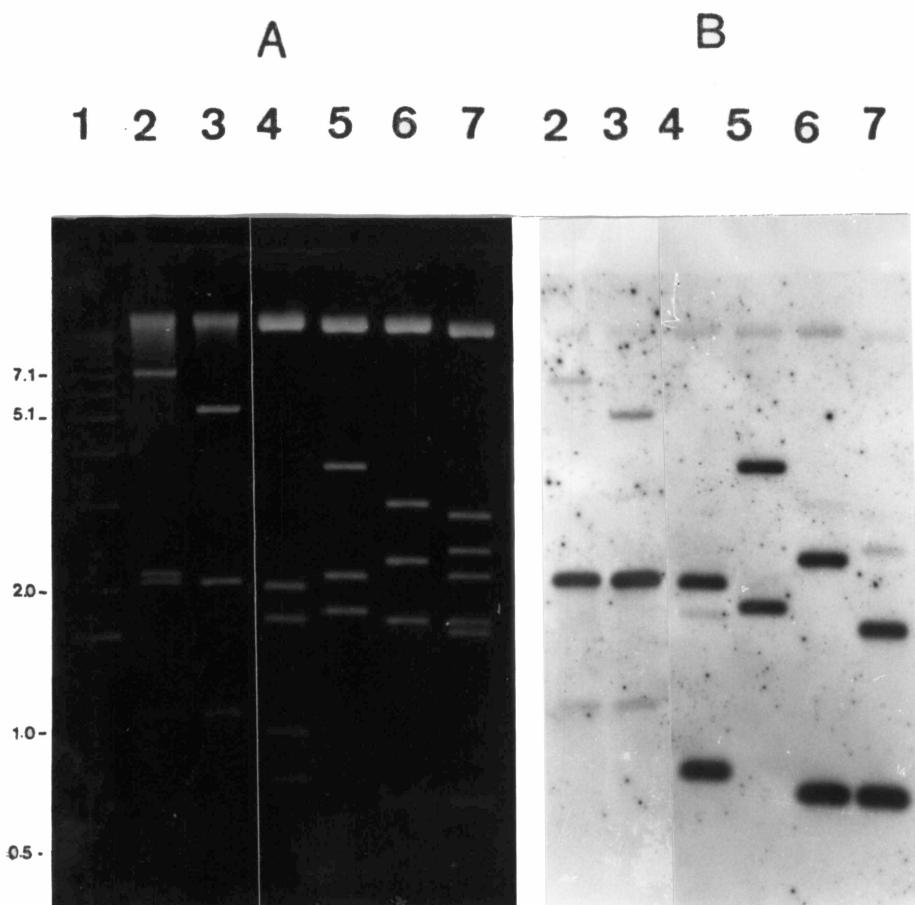
Os plasmídeos pEMS1 e pEMS101 foram digeridos com enzimas de restrição, eletroforisados em gel de agarose 0,9% (2.9.) e hibridizados em condições de baixa estringência (2.28.2.) com o fragmento Sal I do plasmídeo pMC71A marcado com ^{32}P (2.24.2.).

A. Perfil eletroforético de fragmentos de restrição:

- 1- 1kb ladder
- 2- pEMS1 digerido com Sal I
- 3- pEMS101 digerido com Sal I
- 4- pEMS101 digerido com Eco RI
- 5- pEMS101 digerido com Pst I
- 6- pEMS101 digerido com Bal II
- 7- pEMS101 digerido com Pst I/Bal II

B. Autoradiografia da hibridização de A com a sonda A marcada com fósforo radioativo.

FIGURA 14 - HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pEMS1 E pEMS101 COM O FRAGMENTO Sal I/Sma I DO PLASMÍDEO pMC71A



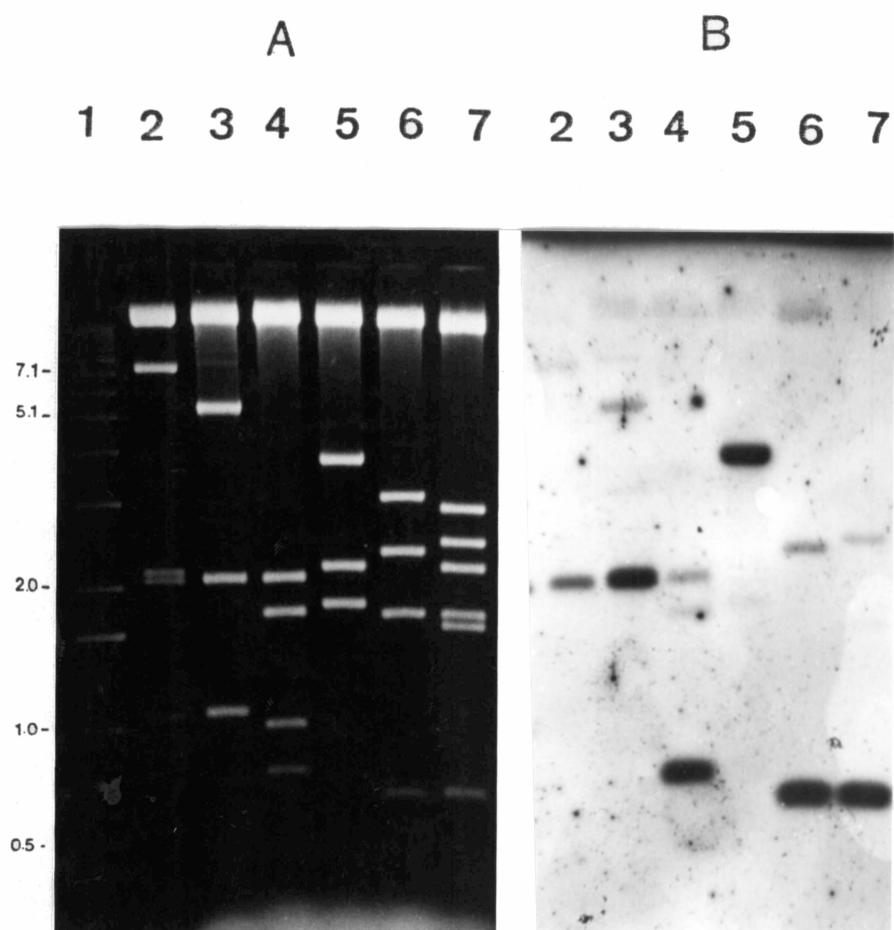
Os plasmídeos pEMS1 e pEMS101 foram digeridos com enzimas de restrição, eletroforisados em gel de agarose 0,8% (2.9.) e hibridizados em condições de baixa estringência (2.28.2.) com o fragmento Sal I/Sma I do plasmídeo pMC71A marcado com ^{32}P (2.24.2.).

A. Perfil eletroforético de fragmentos de restrição:

- 1- 1 kb ladder
- 2- pEMS1 digerido com Sal I
- 3- pEMS101 digerido com Sal I
- 4- pEMS101 digerido com Eco RI
- 5- pEMS101 digerido com Pst I
- 6- pEMS101 digerido com Bgl II
- 7- pEMS101 digerido com Pst I/Bgl II

B. Autoradiografia da hibridização de A com a sonda B marcada com fósforo radioativo.

FIGURA 15 - HIBRIDIZAÇÃO DO PLASMÍDEO pEMS1 E pEMS101 COM O FRAGMENTO Nru I DO PLASMÍDEO pMC71A



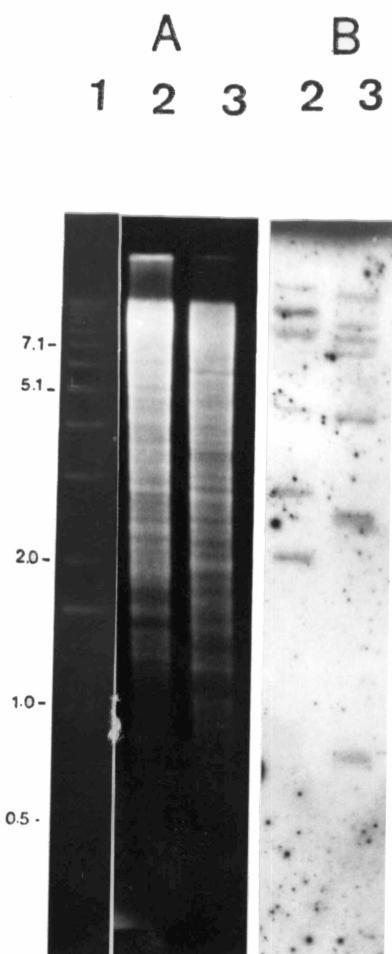
Os plasmídeos pEMS1 e pEMS101 foram digeridos com enzimas de restrição, eletroforisados em gel de agarose 0,9% (2.9.) e hibridizados em condições de baixa estringência (2.28.2.) com o fragmento Nru I do plasmídeo pMC71A marcado com ^{32}P (2.24.2.).

A. Perfil eletroforético de fragmentos de restrição:

- 1- 1 kb ladder
- 2- pEMS1 digerido com Sal I
- 3- pEMS101 digerido com Sal I
- 4- pEMS101 digerido com Eco RI
- 5- pEMS101 digerido com Pst I
- 6- pEMS101 digerido com Bgl II
- 7- pEMS101 digerido com Pst I/Bgl II

B. Autoradiografia da hibridização de A com a sonda C marcada com fósforo radioativo.

FIGURA 16 - HIBRIDIZAÇÃO DO DNA CROMOSOMAL DE H. seropediceae
COM O GENE nifA DE K. pneumoniae



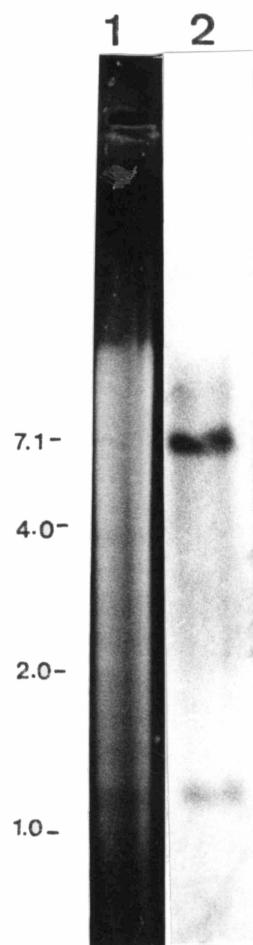
DNA total de H. seropediceae foi digerido com enzimas de restrição, eletroforisados em gel de agarose 0,8% (2.9.) e os fragmentos foram hibridizados em condições de baixa estringência (2.28.2.) com o fragmento Nru I plasmídeo pMC71A marcado com ^{32}P (2.24.2.).

A. Perfil eletroforético de fragmentos de restrição:

- 1- 1 kb ladder
- 2- DNA digerido com Sal I
- 3- DNA digerido com Eco RI

B. Autoradiografia da hibridização de A com a sonda C marca do fósforo radioativo.

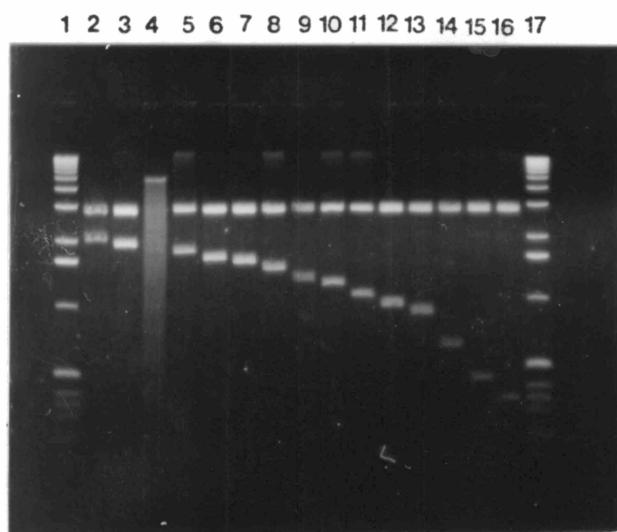
FIGURA 17 - HIBRIDIZAÇÃO DO DNA CROMOSOMAL DE H. seropedicae
COM OS GENES nifHDK DE R. leguminosarum bv.
phaseoli



DNA cromosomal de H. seropedicae foi digerido com Eco RI, eletroforisado (2.9.) e os fragmentos foram hibridizados (2.28.3.) com o fragmento Eco RI de 4,1 kb do plasmídeo pCQ12 marcado com dUTP-digoxigenina (2.24.3.).

- 1 DNA de H. seropedicae digerido com Eco RI.
- 2 Hibridização de 1 com os genes nifHDK de R. leguminosarum bv phaseoli marcado com dUTP-digoxigenina.

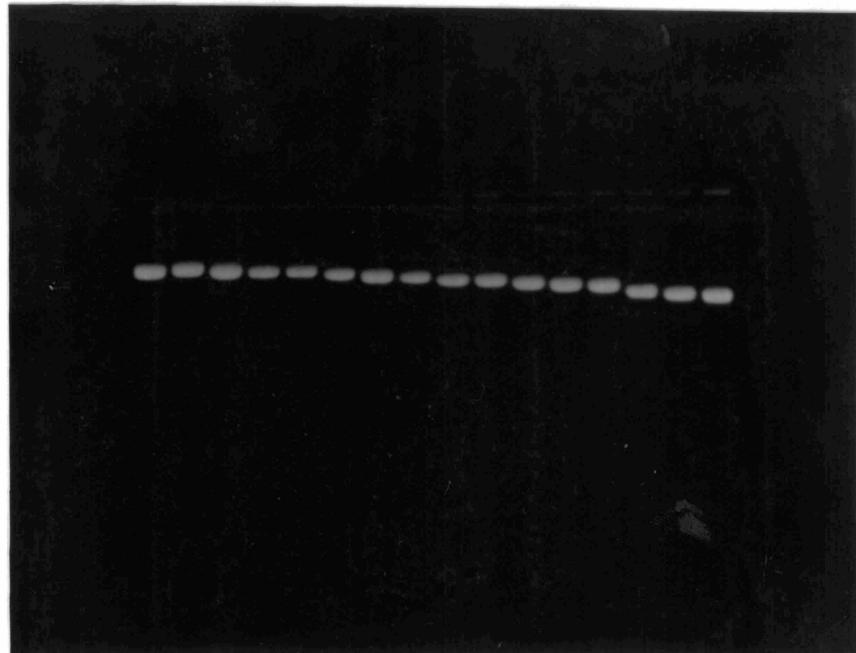
FIGURA 18 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS DERIVADOS DO pEMS300



Os plasmídeos foram isolados (2.11.2.1.) de *E. coli* 71-18, digeridos com as enzimas Hind III/Sac I e eletroforisados em gel de agarose 1,0% (2.9.).

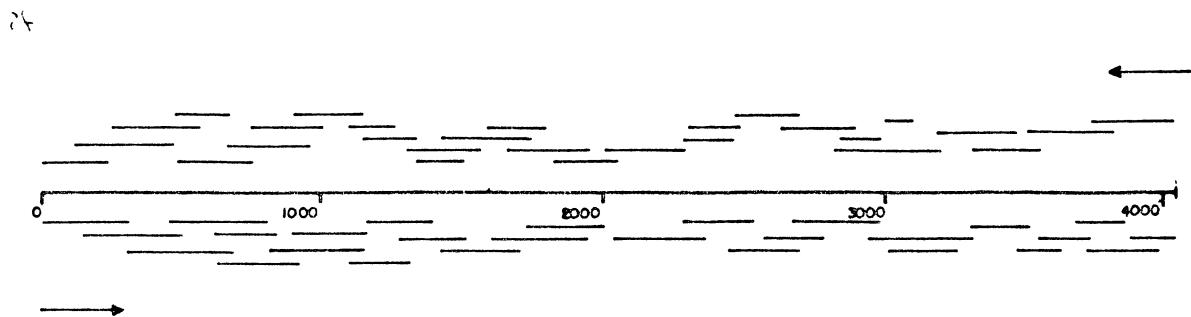
1 1 kb ladder
2 pEMS300 digerido com Hind III/Sac I
3-16 derivados por deleção de pEMS300 digeridos com
Hind III/Sac I
17 1 kb ladder

FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA DE FITA SIMPLES DO PLASMÍDEO pEMS301 E SEUS DERIVADOS



DNA de fita simples foi isolado E. coli 71-18 co-infectada com o fago MK07 (2.34.). Da esquerda para a direita estão o plasmídeo pEMS301 e seus derivados por deleção, por ordem de tamanho.

FIGURA 20 - SOBREPOSIÇÃO DOS FRAGMENTOS SEQUENCIADOS EM
AMBOS OS SENTIDOS



Os traços horizontais indicam a extensão da sequência obtida para cada clone e as setas o sentido de leitura. A linha central representa toda a região sequenciada e a posição dos nucleotídeos.

FIGURA 21 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO GENE nfia
DE H. seropedicae

CGAATTCCATCCGGCCGTTGCTGAGCAGGTCCAGCGTGGCGACGTCTCGGCAACCGCA
 10 20 30 40 50 60

AGGGATCATTGAGCGCCAGCAACGAAGCGCCCGTACCGAGGCAGGATGCGCGAAGTGGTG
 70 80 90 100 110 120

CGGCGATCTGGGCCAGCAGCACCATCAAGGCGCTGCCGATGGCGAAGCTGCTGTAATGGT
 130 140 150 160 170 180

GCTCGGCACCCAGACATCGTATAGCCCAGGGCCTCTGCCACGACGGCATGATCGACGG
 190 200 210 220 230 240

TCTGCAACAGCGCATCGCGTGCCTGCCATGGGATTTGACATTGAGGAAGACGCCGT
 250 260 270 280 290 300

←

AGCGTTGCCGGTAATCCGGCATGGCAGGTTCACGGGAAAAAGAGTTGGACATCGCTCAGA
 310 320 330 340 350 360

CGGGCCGGATCAAGAAACAGATGGGGGATGCGATGCCGGATGGCGCAGGTATGATTG
 370 380 390 400 410 420

GATCTTCCCAGATGGCCGGATCAGATCCGCTATCGGCGGCAGCATGTCGGTGGCGGGAG
 430 440 450 460 470 480

TGGAACAGCTGCGTACCAAGCTCATTAGGGTAGCGCCGCCGGTTGACGCCGCGATGA
 490 500 510 520 530 540

CGTACCAAGCAGATGAATCGACAAGGGTTGGCCCAGGCCAGAACGTCGGCCCGCAGGGCG
 550 560 570 580 590 600

GGCGGAAACCGATATCGTCAAAGGTATGCCAAAGCTGTACCAAGCCACAGTTGGCGCCAG
 610 620 630 640 650 660

CTTCGTCCAATAGCAACGGCAAGCCTGGCCGTTGCAAGATGGCATGGCGTTGGCTGT
 670 680 690 700 710 720

AGTAGAGCGGACCGCCGATGACTCCACCAAGTGGCGATGCCGAGCTGACGCAAT
 730 740 750 760 770 780

CAAAACAATTGTGCGAACGTGCGAACAGCGGGGAATGGCGCAGGCCGCGGATATGATGCA
 790 800 810 820 830 840

—

GCACCAAGTTGCGCAAGCCGGATTCACTCACACAGCGCCAGCAACCGGTGCGCCGTTGAGG
 850 860 870 880 890 900

—

TAATTGTGGCGGCTCACATATCACCTGTTGCGTGCCTGCCGCGCCATGCCGGCCGGCGA
 910 920 930 940 950 960

NtrC binding

CCGGCCAGTTCAAGGGTCAGATAACATGCCTGGGAGCAGGGCGCCAGCACGCACGTGGTG
 970 980 990 1000 1010 1020

site

CACCGGGTTCGGAAGTCGAAGGCACATTCACTAGTGGGCATGGTGGATGTTGGAGGTCTG
 1030 1040 1050 1060 1070 1080

-24/-12 promoter

TATATCTCGCTACATAACGCTGGCTGGGCTACCGGCTTGCTCTGCCTTGTCTGCTT
 1090 1100 1110 1120 1130 1140

GGCCGGTGAGCGGCCGATGCAGGTATGAATAGCCAAAACCATGCCATACAATATTTCT
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

NifA bin-

TTTAAATCAATGGGATAGCGACGATTCTGATTGCTGCGCCAGTGGCGATGATTGTCTGTA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260

ding site

AATCCGACAAAGACGACACCGTTGTCGCCAACCGCCAAGGGCGACATCGAGGAAAGCCGG
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

-24/-12 promoter

CATTGTGTGGGGTTGCTTGGCGAGATCGATTCATGCATGCTTGGGCATGAAGTTGCT
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

TGACCAGCAAGGTAACATTGGTAATTACACGGCGCTTTCTGCCGTTTCAGGATC
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

TCGGATCTCACGACAGAGTAGCAAGGCGGGTTCTAGCGCTCTCAGGCAGCGCATGGGTT
 1450 1460 1470 1480 1490 1500

S.D. M A T I L

CCAGTATTACGTTAGGAGAGTCAGATGCCACTATTCTGACGACCGCAGTGTGAATTT
 1510 1520 1530 1540 1550 1560

AGAACTCGTAACGATTACGGAGATCAGCAAGATATTGGGTTCATCGCTGGATCTATCAA
 1570 1580 1590 1600 1610 1620

GACCTTGCAGGAAGTCCTCAACGTCCCTCCGCCACCTGGAAACGAAACGGGTATTGCT
 1630 1640 1650 1660 1670 1680

GAGTCTGATGCAGGACTCCGGTGAATTGCAACTGGTCAGCGCCATCGGCCTGAGTTACGA
 1690 1700 1710 1720 1730 1740

AGAATTCCAGAGTGGCAGATACCGGGTGGCGAGGGCATACCGGCAAGATCTTCCAGAC
 1750 1760 1770 1780 1790 1800

GGAAACTCCCATCGTGGTGCAGACTTGGCCACGGAGCCGCTGTTCTGGCTCGCACCAAG
 1810 1820 1830 1840 1850 1860

CCCGCGCCAGTCGAAGACGGGAAAGTCATTCCTTGTGGCGTGGCAGTCAAGGCTGC
 1870 1880 1890 1900 1910 1920

CCGTGAAATGCTGGGTGTGCGTTTCGGGATGGACAATGCCCTCGCGTAGTGT
 1930 1940 1950 1960 1970 1980

CGACCATGAGGTGCGCCTGCTGACCATGGTGGCCAACCTGATGGACAAACCGTCCGGCT
 1990 2000 2010 2020 2030 2040

GTATCGCAGCGTAGCGGCCAGCGAGCTGCAAGAGGAAAGCGCCAGCTGTCCCCG
 2050 2060 2070 2080 2090 2100

GCAACTCCAGGGCAAGTACAAGCTCGATAACGTAATCGGCATTCCAAGGGATGCAAGGA
 2110 2120 2130 2140 2150 2160

AGTGTTCGCGCAGGTACACCAAGTCCGCCCTCGCGGTGACCATGCTGTTGCGCGCGA
 2170 2180 2190 2200 2210 2220

GAGCGGCACCGGCAAGGAAGTCATCGCGCGGCCATCCATTACCTCAGTCCCGCGCAAGGA
 2230 2240 2250 2260 2270 2280

TGGGCCATTCAAGGTCAACTGTGCGGCCTTGTGGAAACCTTGCTGGAATCCGATT
 2290 2300 2310 2320 2330 2340

GTTTGGCCAGGGAGAAGGGCGCCTTCACCGGGGCCAGGGTGAACGCAAGGGCGTTCGA
 2350 2360 2370 2380 2390 2400

ACTCGCCCATGGCGGCACCTTGTTCCTCGACGAGATCGGCGAGATCTCGCCGGCCTTCCA
 2410 2420 2430 2440 2450 2460

GGCCAAGGTGCTGCGGGTATTGCAGGAGCGTGAATTGAGCAGGTGGTGGGTGCGCTTC
 2470 2480 2490 2500 2510 2520

GATCAAGGTGGACGTGCGTCTGGTCACCGCCACCAACCGCGACCTGGAGAAGGCCGTGGC
 2530 2540 2550 2560 2570 2580

CAAGGGCGAGTTCCGGGCCGACCTGTATTACCGTATGAATGTGGTCAGCATCTTCATTCC
 2590 2600 2610 2620 2630 2640

TCCGCTGCGCGAACGGCGCGAGGATATTCCCTATCTGGTGGAACACTTCCTGGAAAAATT
 2650 2660 2670 2680 2690 2700

CCGTGTGGAGAACCGCGCGCCATGGTGGCCATGTCACCGCAGGCCATGAAGGTGATGAT
 2710 2720 2730 2740 2750 2760

GAATTGCTACTGGCGGGCAATGTACGGGAACGGAAATTGTGTCAGCGTACTGGCAC
 2770 2780 2790 2800 2810 2820

CATGATGCGCGGGCGATCTGATCACCGAGGGTGCATTTCTCTGTCAAGCAGAACAAATGCC
 2830 2840 2850 2860 2870 2880

GACCAAGGTCTTGCATGAACCCGGCCAGCAGCAACCGGTGTTGGTGGTGGCGCTGGAGCG
 2890 2900 2910 2920 2930 2940

CATATCCGCGGCCATACGGCGCCATCTCGCCGAGTGGATGCCAAGGACAAGCCACTGG
 2950 2960 2970 2980 2990 3000

CGCCGCGCCCCCGACCTCCGAACGCGAACGTCTTATCTGGGCCATGGAGCAATGTGGCTG
 3010 3020 3030 3040 3050 3060

GGTGCAAGCCAAGGCAGCCCGCGCACTCAACATCTGCCCGCCAGATGGCTATGGCT
 3070 3080 3090 3100 3110 3120

*

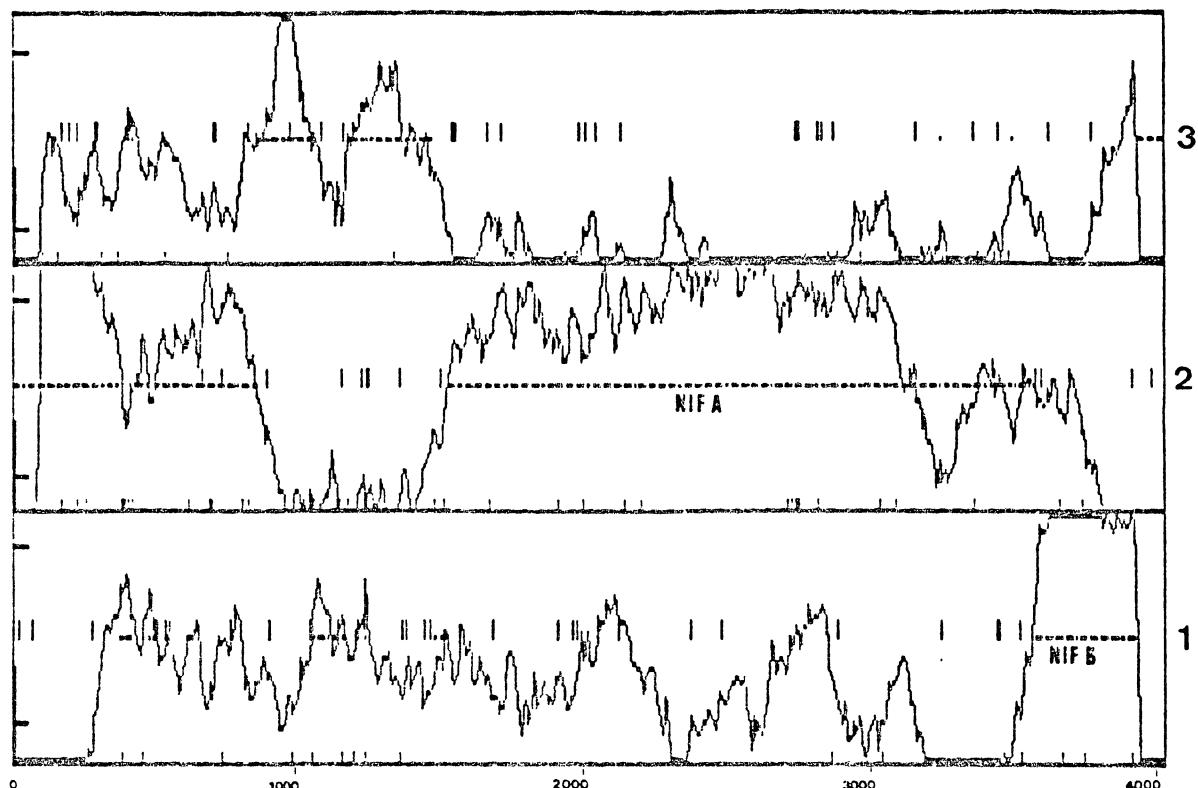
GCAGAAATTCAATATCGAGGTCAAGAAGTTCTGAAACTCATCTGCGAGCGTGACGTAATA
 3130 3140 3150 3160 3170 3180

CGCTGCCAGATCCAAAGTCTTTCTCATTGCCGTCTGCCCTGCGCGCGGGTCTCTT
 3190 3200 3210 3220 3230 3240

CGGCCTCGCGCCAGCCGGTTGTATTGATGGATTCCCCGGCTGGCACGTCTCGCATTCT
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 CCTTCTCCTTCTCCACTGCGTCAGGCTCATTGCGGCCGCTCAATTGCAGGCGCCGGCCC
 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 NifA binding site NifA binding site
 GTGCTGCATTGTCGTGTCATGACAAGGCCACCCACAATGTATGCCGATTGTCGCTAT
 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 ding site
 CCTCACATGCCGTACGACGAAATTCTCCGCTATGTCATTGAATTGATTGATTATTTGT
 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 -24/-12 promoter S.O.
 CTGGCACGGTTTGGCTATGTCCTCAGGAGAAGGCCAGGCATCACTTCTGAAAGGGA
 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 M Q P T Q
 CTATCCATGCAGCCCACACAATACTCGGTATCCAGGACATCAAATCGCTAGGCACCTG
 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 CTGGACAAGGTAGCCGAACACAAAGGCTGTGGCACCCAGCAGTGAAGGCGGAAAGCCAGT
 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 TGCCTTCATCCGATGGTCCCGCCGACATGGCGCCGAGGTTGGAAAAGGTCAAGAAC
 3670 3680 3690 3700 3710 3720
 CATCCCTGCTACAGCGAAGAGGCTCATCACCACTATGCCGTATGCACGTGGCGGTGGCA
 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 CCGGCCTGTAACATCCAGTGCAACTACTGCAACCGCAAATACGATTGCGCCAACGAGTCG
 3790 3800 3810 3820 3830 3840
 CGTCCAGGCGTGGTCAGCGAAAAGCTCACGCCGAACAAAGCGGCCAAGAAGGTCTTGC
 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 GTGGCCTCGACCATTCGGCAGATGACGGTGCTGGCATTGCCGGTCTGGGACCCGCTG
 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 GCCAATCCGGCCAAGACCTTCAAGACCTTCGAGCTGATTCGGCAGACCCGCCGATATC
 3970 3980 3990 4000 4010 4020
 AAGCTGTGCCTGTCGAC
 4030

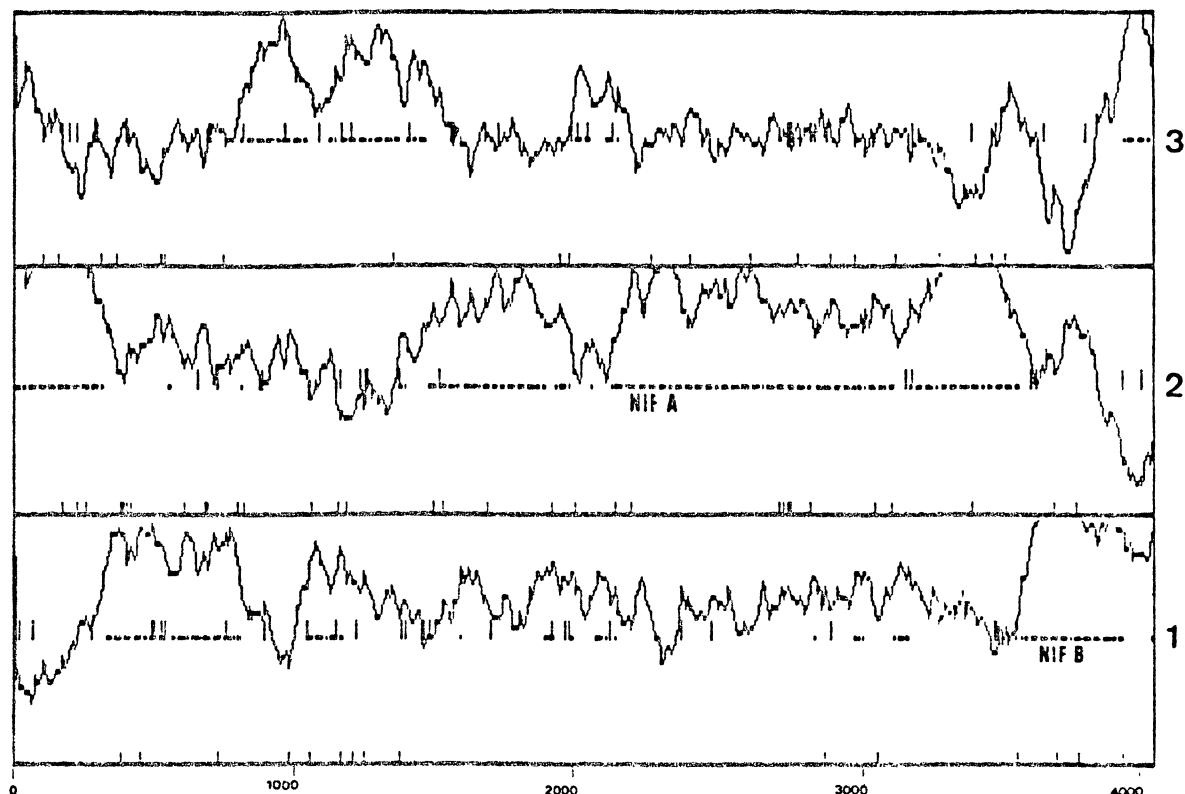
As sequências regulatórias prováveis e sítios potenciais de ligação de ribosomos estão sublinhados. O produto de tradução do gene nifA inicia na posição 1526 e termina na posição 3154, enquanto que a proteína NifB inicia na posição 3547. Os primeiros cinco aminoácidos de cada proteína estão indicados e o codon de parada do gene nifA está assinalado com um asterisco. As barras horizontais sobre a sequência (880-950) indicam possíveis estruturas de promotor -24/-12 na direção contrária àquela da transcrição do gene nifA e a seta indica o primeiro codon e direção de transcrição de uma possível ORF1.

FIGURA 22 - IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS REGIÕES CODIFICADORAS
DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE PREFERÊNCIA
POSICIONAL DE BASES



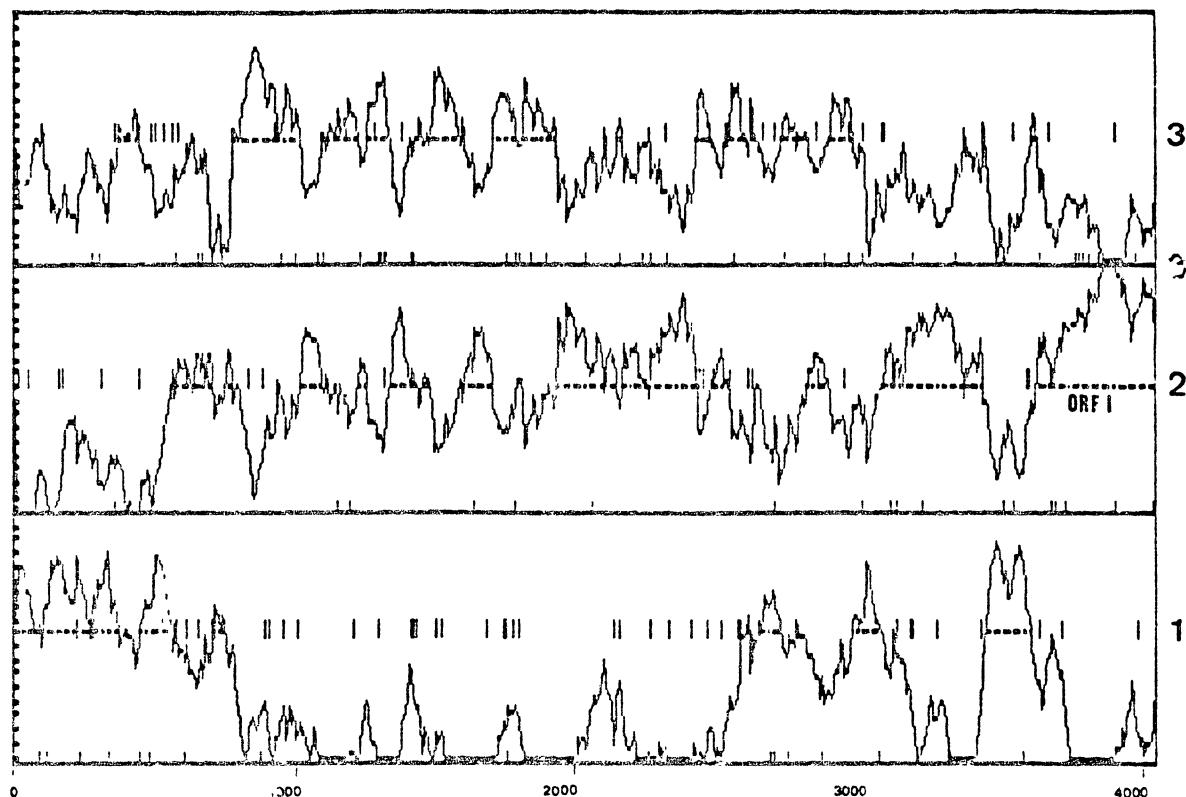
Os números 1, 2 e 3 representam as três fases de leitura. As ordenadas são $\log(P/(1 - P))$ onde P é a probabilidade da região ser codificadora. Ao nível de 50% de probabilidade o programa assinala um ponto na fase de leitura de mais alta probabilidade. Ainda neste nível é assinalada a presença de codons de terminação com pequenas barras verticais. Na abscissa de cada fase de leitura o programa assinala codons de iniciação com pequenas barras verticais.

FIGURA 23 - IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS REGIÕES CODIFICADORAS
DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE SHEPHERD



Os números 1, 2 e 3 representam as três fases de leitura. As ordenadas são $\log(P/(1 - P))$ onde P é a probabilidade da região ser codificadora. Ao nível de 50% de probabilidade o programa assinala um ponto na fase de leitura de mais alta probabilidade. Ainda neste nível é assinalada a presença de codons de terminação com pequenas barras verticais. Na abscissa de cada fase de leitura o programa assinala codons de iniciação com pequenas barras verticais.

FIGURA 24 - IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS REGIÕES CODIFICADORAS DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE USO PREFERENCIAL DE CODONS



Os números 1, 2 e 3 representam as três fases de leitura. As ordenadas são $\log(P/(1 - P))$ onde P é a probabilidade da região ser codificadora. Ao nível de 50% de probabilidade o programa assinala um ponto na fase de leitura de mais alta probabilidade. Ainda neste nível é assinalada a presença de codons de terminação com pequenas barras verticais. Na abscissa de cada fase de leitura o programa assinala codons de iniciação com pequenas barras verticais. A sequência está disposta em sentido reverso daquele do sentido de transcrição do gene nifA. A tabela de uso de codons foi construída a partir dos genes nifA e nifB.

FIGURA 25 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NIFA DE *H. seropedicea* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

+

HsNifA	INVVSIFIPPLRERREDIPYLVEHFLEKFRVENQRAMVAMSPQAMKVMMNCYWPVNREL
AcNifA	IHVVPILPPLRERPGDIPKLAKNFLDRFNKENKLHMM-LAPAIDVLRRCYFPVNREL
RINifA	INVVPILPPLRQRDGDISLLAQVLEQFNNANDRNC-DFGPAIDILSKCAFVNREL
RmNifA	ISGVPLILPPLRHRDGDIPLLARAFLQRFNEENRDL-HFAPSALDHLSKCKFPVNREL
KpNifA	LNVMPIALPPLRERQEDIAELAHFLVRKIAHSQGRT-LRISDGAIIRLLMEYSWPGVNREL
Consenso	<u>*..***.*PPLR*R.*DI*.L*.**.**.**.*****.**..A*.**.*PGVNREL</u>

+

+ +

HsNifA	ENCVERTATMNRGDLITEVHFSCQQNKCLTKVLHEPGQQQPVVV-----VPLERIS-AP
AcNifA	ENCIRRTATLAHDAVITPHDFACDSGQCLSAMLWGSAPKPVMPHVPPAPTPLTSPAP
RINifA	DNCVQRTATLASSNTITSSDFACQQDQCSSALLRKADGDGIGNDAMN-GLNSRDTMSGGL
RmNifA	ENCVRRTATLARSKTITSSDFACQTDQCFSSRLWKGVHCSGHIEID-APAGTTPLLGAP
KpNifA	ENCLERSAVLSESGLI-----
Consenso	<u>*NC*.R*A**..*..I.....</u>

E

HsNifA	YGAIFAEWDGQQQATGAAPPT-----SERERLIWAMEQCGWVQAKAARALN
AcNifA	LATAAAPAAASPAPAADSLPVTCGTEACPAVPPROSEKEOLLOAMERSGKVQAKAARLLN
RINifA	CAHAGT-----PSGAAATIEAAGLTERDRLIKAMERAGWVQAKAARI LG
RmNifA	-ANDVP-----PKEPGSAGVASNLIERDRLISALEEAGWNQAKAARILE
KpNifA	-DRDVILFNHRDNPPKALASSGPAEDGW--LDNSLDERQRLIAALEKAGWVQAKAARLLG
Consenso	<u>.*.....E***L*.A*E..GW.QAKAAR.L*</u>

HsNifA	ISPRQMGYALQKFNIEVKKF
AcNifA	LTPRQVGYALRKYDIDIKR
RINifA	KTPRQVGYALRRRHRIDVKKE
RmNifA	KTPRQVGYALRRRHGVDRVKL
KpNifA	MTPRQVAYRIQIMDITMPPL
Consenso	<u>.*PRO**Y.*...***.*.</u>

HsNifA, NifA de *H. seropedicae*; AcNifA, NifA de *A. caulinodens*; RINifA; NifA de *R. leguminosarum* bv. *viciae*; RmNifA, NifA de *R. mellioti*; e KpNifA, NifA de *K. pneumoniae*. O critério adotado na dedução da sequência de consenso foi a presença do mesmo resíduo de aminoácido, na mesma posição, em todas as cinco proteínas. Os domínio A, C, D e E estão delimitados como originalmente proposto por Drummond *et al.* (1986), embora a homologia compartilhada entre as proteínas na porção N-terminal não seja suficientemente alta para a definição dos domínio A e C. O interdomínio presente entre os domínios D e E está indicado por uma barra horizontal e os resíduos de cisteína conservados pelo símbolo +.

FIGURA 26 - COMPARAÇÃO DO DOMÍNIO D DA PROTEÍNA Nifa DE *H. seropediceae* COM O DE OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

	139	180
HsNifa-VIGISKAMQEVF	
AcNifaGIVGDSPLVKRLI	
RINifaATAQVVARSNSTV	
RmNifaLLRGESGTGKEF	
KpNifaFARA	
Consenso	
		SLAI
	181	240
HsNifa	IHYLSPRKDGPFIKVNCAALSETLLE	
AcNifa	IHELSRKGKPFVKVNCAALPESV	
RINifa	IHALSIRSKAFIKLNCAALSETV	
RmNifa	IHQHSTROKKPFIKFNCPALSE	
KpNifa	IHHNSPRAAAAFVKFNCAALP	
Consenso	DNLLESLEFGHEKG	
		SLATI
	241	300
HsNifa	IGEISPAFQAKLLRVLQ	
AcNifa	IGEITPAFOAKLLRVLQ	
RINifa	IGDVSPQFQAKLLRVLQ	
RmNifa	IGEIPPAFQAKLLRVIQ	
KpNifa	IGESSASFQAKLLRILQ	
Consenso	EQE.FQAKLLR**QE.E*ER*GG*	
		.***V*VR**.ART**LE.*V..G*FR*DLYR
	301	360
HsNifa	INVVSIFPPLRERREDIPYL	
AcNifa	IHVVPILPPLRERPGDIP	
RINifa	INVVPILPPLRQRDGDIS	
RmNifa	ISGVPLILPPLRH RDGDI	
KpNifa	LNVMPIALPPLRERQDIA	
Consenso	ELIPLLAFLORFNEENGRDL	
		-HFAISALDHL
	361	376
HsNifa	ENGVERTATMMRGDLI	
AcNifa	ENGIRRATLAHDAVI	
RINifa	DNCVQRTATLASSNTI	
RmNifa	ENCVRRATLARSKTI	
KpNifa	ENCLERSAVLSESGLI	
Consenso	*NC*.R*A**..*..I	

HsNifa, Nifa de *H. seropediceae*; AcNifa, Nifa de *A. caulinodans*; RINifa; Nifa de *R. leguminosarum* bv. *Viceae*; RmNifa, Nifa de *R. meliloti*; e KpNifa, Nifa de *K. pneumoniae*. O critério adotado na dedução da sequência de consenso foi a presença do mesmo resíduo de aminoácido, na mesma posição, em todas as cinco proteínas. SLA I e SLA II indicam as regiões I e II homólogas a sítios de ligação de nucleotídeos. Os números se referem à sequência consenso.

FIGURA 27 - COMPARAÇÃO DO DOMÍNIO E DA PROTEÍNA Nifa DE *H. seropedicae* COM O DE OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

	1	5	10	15	20
HsNifa	ERERLIWAMEQCGWV	QAKAARA	LNIS	PRQMGYALQ	KFNIEVKKF
AcNifa	EKEQLLQAMERSGWV	QAKAARL	LNLT	PRQVGYALR	KYDIDIKRF
RINifa	ERDRLIKAMERAGWV	QAKAARI	LGKT	PRQVGYALR	RHRIDVKKE
RmNifa	ERDRLLISALEEAGWN	QAKAARI	LEKT	PRQVGYALR	RHGVDVRKL
KpNifa	ERQRLLIAALEKAGWV	QAKAARL	LGMT	PRQVAYRIQ	IMDITMPRL
Consenso	E***L*.A*E..GW.	QAKAAR.	L.*.	PRQ**Y.*	...***.*.

hélice ————— hélice

HsNifa, Nifa de *H. seropedicae*; AcNifa, Nifa de *A. caulinodans*; RINifa; Nifa de *R. leguminosarum* bv. *viciae*; RmNifa, Nifa de *R. meliloti*; e KpNifa, Nifa de *K. pneumoniae*. O critério adotado na dedução da sequência de consenso foi a presença do mesmo resíduo de aminoácido, na mesma posição, em todas as cinco proteínas. Os números se referem aos resíduos do sítio de ligação de DNA. Os resíduos que compõem as hélices estão indicados.

FIGURA 28 - COMPARAÇÃO DO INTERDOMÍNIO D-E DA PROTEÍNA Nifa
DE *H. seropedicae* COM OS DE OUTRAS PROTEÍNAS
HOMOLÓGAS

HsNifa	ITEVHFS	C	QQNK	C	LTKVLHEPGQQQPVVV-----VPLERIS-AP
ACNifa	ITPHDFA	C	DSGQ	C	LSAMLWKGSAPKPVMMPHVPAPTPPLTPLSPAP
RINifa	ITSSDFA	C	QQDQ	C	SSALLRKADGDGIGNDAMN-GLNSRDTMSGGL
RmNifa	ITSSDFA	C	QTDQ	C	FSSRLWKGVHCSHGHIIEID-APAGTTPLLGP
BJNifa	IVRSDDFA	C	SQGQ	C	LSTTLWKSTSYGKTDPAAPMQPVPAKSIIPLA
Consenso	IT..*F*	C	*.**	C	.*.L.*.....*.*..*

HsNifa, Nifa de *H. seropedicae*; AcNifa, Nifa de *A. caulinodans*; RINifa; Nifa de *R. leguminosarum* bv. *viciae*; RmNifa, Nifa de *R. mellioti*; e BJVNifa, Nifa de *B. japonicum*. O critério adotado na dedução da sequência de consenso foi a presença do mesmo resíduo de aminoácido, na mesma posição, em todas as cinco proteínas. Os resíduos de cisteína conservados estão delimitados por linhas.

FIGURA 29 - COMPARAÇÃO DOS PROMTORES DOS GENES nifA E nifB
DE H. seropedicae COM OUTROS PROMTORES ATIVADOS
POR NTRC E NIF A

(a) Promotores ativados por NtrC:

	UAS	-24	-12
<u>KpnifA</u>	TGCACTATATTGGTGCA-----	TTGGCACAGATTCGCT	
<u>KpnifL</u>	TGCACTACCGCGGGCCCA-----	AGGGCGCACGGTTTGCA	
<u>HsnifA</u>	AGCACCGCACGTGGTGCA-----	TGGGCTACCGGCTTGCT	
CONSENSO ¹	GCACY-N ₅ -GGTGCA-----	NTGGCRCR-N ₄ -TTGC ^A _T	

(b) Sítios potenciais para ligação de NifA em promotores de genes nifA:

	UAS	-24	-12
<u>AcnifA</u>	GGTTTCCATTATAACA---	AGGCTGATCCCTCGCA	
<u>KpnifL</u> ²		GGGCGCACGGTTGCA---	TGT-N ₁₀ -ACA
<u>HsnifA</u>	TGTCGTAATCCGACA---	GGGCATGAAGTTGCT	
CONSENSO ¹	TGT - N ₁₀ - ACA---	TGGYAYR-N ₄ -TTGC ^A _T	

(c) Sítios potenciais para ligação de NifA em promotores de genes nifB:

	UAS	UAS	-24	-12
<u>KpnifB</u>		TGTGAGATTCAAGGACA---	CTGGTACAGCAT	TGCA
<u>RmnifB</u>	TGTGGAAAGTCGACA---	TGTGAGCAAAGAGACA---	TTGGCATA	GTGTTGCT
<u>AvnifB</u>	TGTCGCTTGTCTGACA---	TGTCCGTTGCCGACA---	TCGGCACGGGTATTGCT	
<u>HsnifB</u>	TGTGGTGTTCATGACA---	TGTGCTATCCTCACA---	CTGGCACGGTTTGGCT	
CONSENSO ¹	TGT - N ₁₀ - ACA---	TGT - N ₁₀ - ACA---	NTGGYAYR-N ₄ -TTGC ^A _T	

Kp, K. pneumoniae; Rm, R. meliloti; Av, A. vinelandii:
e Ac, A. caulinodans. R denota nucleotídeos púricos, Y
pirimidínicos e N qualquer nucleotídeo.

¹ As sequências consenso são de acordo com Dixon (1987).

² O sítio de ligação do promotor nifL de K. pneumoniae está
localizado após o início de transcrição.

FIGURA 30 - COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA ANAEROBOX E DO SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA IHF ENCONTRADA NO GENE nifA de H. seropedicae COM SEQUÊNCIAS ENCONTRADAS EM OUTROS GENES

(A) Sequências anaerobox:

<u>AcnifA</u>	521	AATTTGATTTACATCAAACC
<u>EcnifB</u>	67	AATTTGATTTACATCAATAA
<u>BjnlfK</u>	2509	GCGTTGATCGAAATCAACCC
<u>Ecfnr</u>	529	AAATTGACAAATATCAATTA
<u>HsnifA</u>	2285	CCATTGATCAAGGTCAACTG
CONSENSO		TTGATNNNNATCAA

(B) Sequência para ligação de IHF:

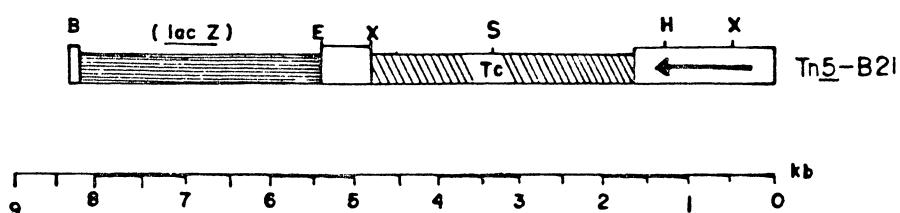
<u>HsnifA</u>	1205	TTTAAATCAATGGGATAGCGA
CONSENSO		WATCAANNNTTR

N, qualquer nucleotídeo; R, adenina ou guanina; W, adenina ou timina. As sequências "anaerobox" foram obtidas de Nees et al. (1988).

FIGURA 31 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA
PROTEÍNA NIFB DE *H. seropedicae* COM OUTRAS
PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

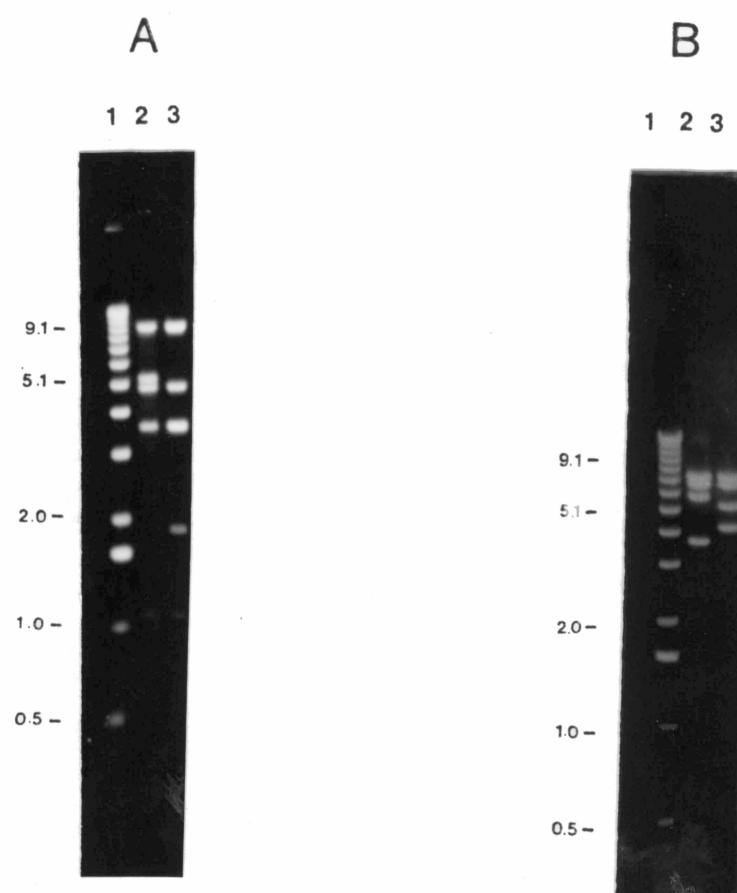
HsNifB	MQPTQYVGIQDIKSLGTLLDKVAEHKGCGTSSEGGKAS-CGSSDGP-ADMAPEVWEKVKN
BjNifB	MQ-----SITEHKGRASAKTGRARL--RSQAGRGPDLPVEIWERVKN
AvNifB	ME-----LSVLGQNNGGQHSAGGCSSSSCGSTHDQLSHLPENIRAKVQN
Consenso	M*.....*****G...S*.*.*****.*****.*****V*N
HsNifB	HPCYSEEAHHYARMHVAVAPACNIQCNYCNRKYDCANESRPGVVSEKLTPEQAAKKVFA
BjNifB	HPCYSEDAHHYARMHVAVAPACNIQCNYCNRKYDCANESRPGVVSEKLTPEQAVRKVIA
AvNifB	HPCYSEEAHHYFARMHVAVAPACNIQCHYCNRKYDCANESRPGVVSEVLTP EQAVKKVKA
Consenso	HPCYSE*AHH**ARMHVAVAPACNIQC*YCNRKYDCANESRPGVVSE.LTPEQA**KV.A
HsNifB	VASTIPQMTVLGIAGPGDPLANPAKTFKTFELISQTAPDIKLCLS-----
BjNifB	VATTIPQMTVLGIAGPADALANPAKTFKTLALVTEAAPDIKLCLSTNGLALPDYVDTIVR
AvNifB	VAAAIPQMSVLGIAGPGDPLANPKRTLDTFRMLSEQAPDMKLCVSTNGLALPECVEELAK
Consenso	VA**IPQM*VLGIAGP*D*LANP.*T**T*.****.APD*KLC*S.....

HsNifB, NifB de *H. seropedicae*; BjNifB, NifB de *B. japonicum*; e AvNifB, NifB de *A. vinelandii*. O critério adotado na dedução da sequência de consenso foi a presença do mesmo resíduo de aminoácido, na mesma posição, em todas as cinco proteínas.

FIGURA 32 - MAPA DE RESTRIÇÃO DO TRANSPOSON Tn5-B21

As enzimas de restrição são: E, Eco RI; S, Sal I; H, Hind III; B, Bam HI e Xba I. O mapa de restrição foi obtido de Simon *et al.* (247), com exceção da localização do sítio para Sal I que foi determinado.

FIGURA 33 - DETERMINAÇÃO DO PONTO DE INSERÇÃO DO TRANSPOSON Tn5-B21 NOS PLASMÍDEOS pEMS109 E pEMS110



Os plasmídeos contendo Tn5-B21 foram isolados por minipreparação (2.11.1.2.) e mapeados com enzimas de restrição (2.22.). Os plasmídeos pEMS109 e pEMS110 contêm inserção nos genes *nifA* e *nifB*, respectivamente. No painel A a eletroforese foi desenvolvida a 2 V/cm durante 14 horas e no painel foi a 8 V/cm durante 2 horas.

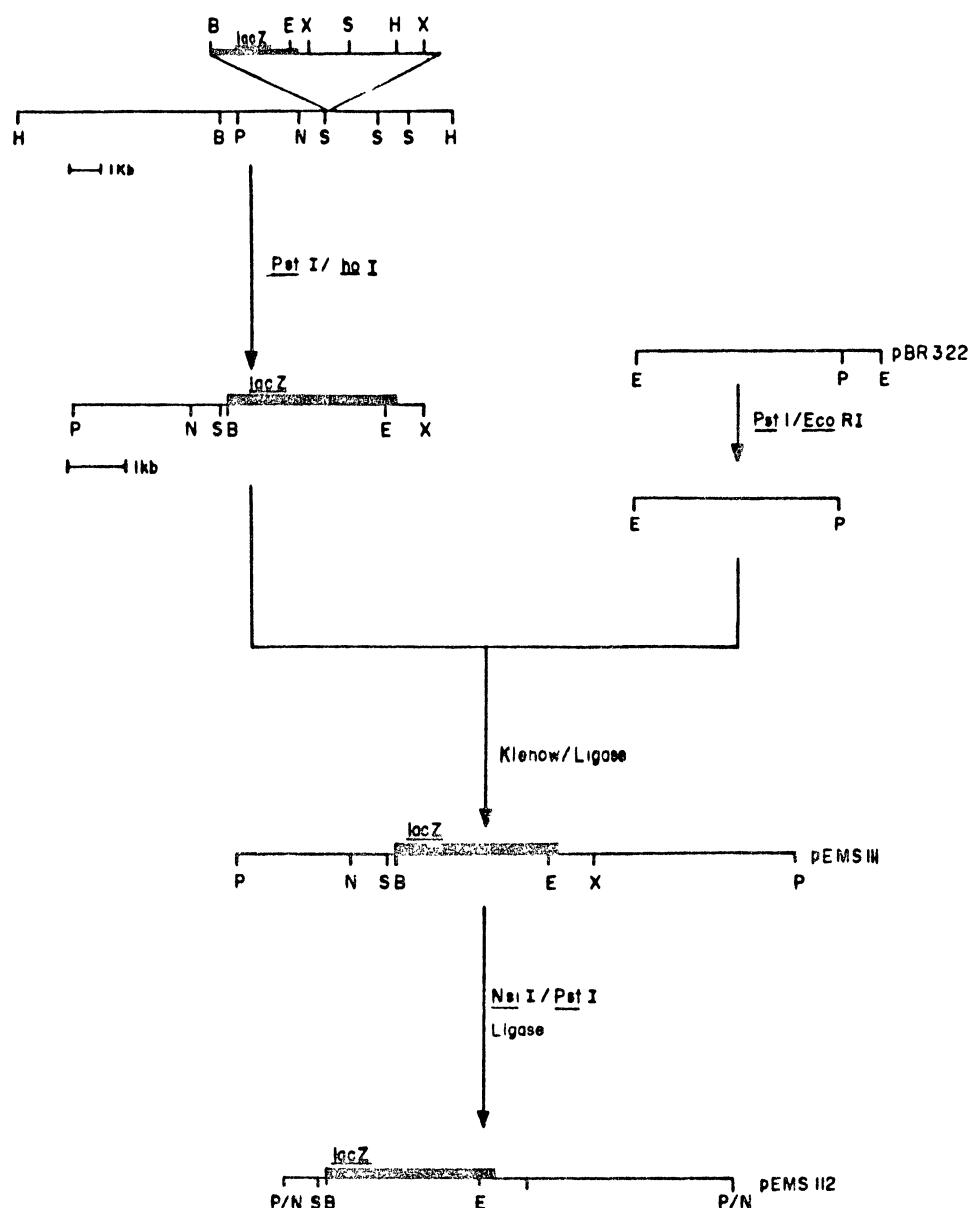
A.

- 1- 1 kb ladder
- 2- pEMS109 digerido com Sal I/Bam HI
- 3- pEMS110 digerido com Sal I/Bam HI

B.

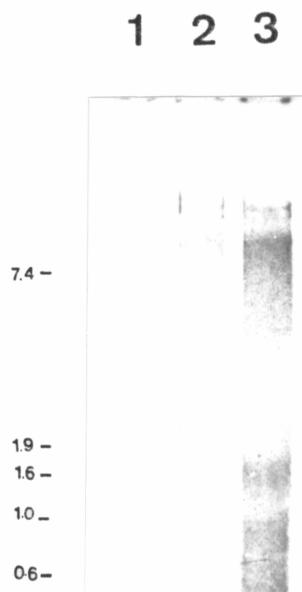
- 1- 1 kb ladder
- 2- pEMS109 digerido com Bam HI/Hind III
- 3- pEMS110 digerido com Bam HI/Hind III

FIGURA 34 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DERIVADOS DE pEMS109



As enzimas são: E, Eco RI; P, Pst I; X, Xba I; N, Nsi I; S, Sal I; H, Hind III; e B, Bam HI. A linha mais densa representa o gene lacZ.

FIGURA 35 - HIBRIDIZAÇÃO DO RNA TOTAL DE A. brasiliense
FP10 (pEMS107) COM SONDA CONTENDO O GENE nifA DE
H. seropedicae



RNA total foi isolado em condições de repressão ou de desrepressão para nitrogenase, eletroforisado em condições desnaturantes e hibridizado com o fragmento Sal I/Bgl II do plasmídeo pEMS300 (2.29.).

- 1- RNA de FP10 (desrepressão)
- 2- RNA de FP10(pEMS107) (repressão)
- 3- RNA de FP10(pEMS107) (desrepressão)

TABELA 3 - Frequência de conjugação do banco de genes de *H. seropedicae* com *A. brasiliense* estirpe FP10

Nº total de bactérias	Nº de <i>Azospirillum</i>	Nº de <i>Azospirillum Km^R</i>	Frequência de Conjugação
10^{10}	3×10^9	2×10^5	7×10^{-5}

A conjugação tripla foi feita conforme Materiais e Métodos (2.20.2.). A contagem de bactérias totais foi feita em meio LA e o número de *A. brasiliense* e de *A. brasiliense* contendo plasmídeo recombinante foi determinado em meio NFbHPN contendo ácido nalidíxico (10 µg/ml) e em meio NFbHPN contendo ácido nalidíxico (10 µg/ml) e canamicina (50 µg/ml), respectivamente. A frequência de conjugação por receptor foi calculada de acordo com Materiais e Métodos (2.20.1.).

TABELA 4 - Complementação do mutante FP10 de *A. brasiliense*
pelo plasmídeo recombinante pEMS1

Estirpe de <i>A. brasiliense</i>	Atividade de nitrogenase (nmol C ₂ H ₄ .min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹)
FP2	24,2 (\pm 1,64)
FP10	0,0
FP10.9 ¹	23,1 (\pm 8,03)
FP10.29 ⁴	27,9 (\pm 4,72)
FP10.31 ¹	29,1 (\pm 4,36)
FP10.9(R68.45) ²	0,0
FP10.29(R68.45) ²	0,0
FP10.31(R68.45) ²	0,0
FP10(pEMS1) ³	27,8 (\pm 0,24)

A atividade de nitrogenase foi determinada em meio NFbHP semi-sólido, como descrito em Materiais e Métodos (2.8.2.). Todos os ensaios foram feitos em triplicada. Os números entre parênteses são o erros padrão da média.

¹ Transconjugantes de *A. brasiliense* estirpe FP10 contendo plasmídeo recombinante *nifA*⁺.

² Os plasmídeos recombinantes dos transconjugantes de *A. brasiliense* FP10 foram eliminados pelo plasmídeo R68.45.

³ O plasmídeo recombinante pEMS1 foi isolado do transconjugante FP10.9 (2.11.1.2.), transformado em *E. coli* HB101 (2.21.) e novamente transferido para o mutante de *A. brasiliense* estirpe FP10 (2.20.2.).

TABELA 5 - Complementação de outros mutantes Nif^- de *A. brasiliense* pelo plasmídeo recombinante pEMS1

Estirpe de <i>A. brasiliense</i>	Atividade de nitrogenase (nmol $C_2H_4 \cdot min^{-1} \cdot mg\ de\ proteína^{-1}$)
FP2	19,9
FP3	0
FP6	0
FP8	0
FP9	0
FP3(pEMS1)	0
FP6(pEMS1)	0
FP8(pEMS1)	0
FP9(pEMS1)	0

A atividade de nitrogenase foi determinada em meio NFBHP semi-sólido, como descrito em Materiais e Métodos (2.8.2.).

TABELA 6 - Plasmídeos derivados de pEMS1 e suas capacidades de complementarem o mutante FP10

Plasmídeo	Fragmento clonado	Fenótipo no mutante FP10
pEMS102	<u>Sal</u> I, 1,0 kb	-
pEMS103	<u>Sal</u> I, 2,0 kb	-
pEMS104	<u>Sal</u> I, 1,0 + 2,0 kb	-
pEMS105	<u>Sal</u> I, 7,1 kb	-
pEMS101	deleção frag. <u>Bam</u> HI, 21 kb	+
pEMS106	<u>Cla</u> I, 5,2 kb	+
pEMS107	<u>Cla</u> I, 5,2 kb	+

Os plasmídeos recombinantes foram transferidos para o mutante de *A. brasiliense* estirpe FP10 por conjugação (2.10.2.) e a atividade de nitrogenase dos transconjugantes foi determinada em meio NFbHP semi-sólido (2.8.2.). O vetor de todos os plasmídeos foi o cosmídeo pVK102. +, complementa o mutante FP10 para fixação de nitrogênio (redução de acetileno); -, não complementa o mutante FP10 para a fixação de nitrogênio (redução de acetileno).

TABELA 7 - Homologia entre a proteína NifA de *H. seropedicae* e as de *K. pneumoniae*, *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* e *A. caulinodans* nos domínios D e E

Domínio	Kp	Rm	RI	Ac
D (238 resíduos)	56%	62%	62%	68%
E (36 resíduos)	61%	64%	67%	69%
Total	38%	41%	41%	47%

As sequências de aminoácidos da proteína NifA de *K. pneumoniae* (Bulikema et al., 1985; Drummond et al., 1986), *R. meliloti* (Bulikema et al., 1985), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Gröniger et al., 1987) e *A. caulinodans* (Nees et al., 1988) foram deduzidas das sequências de ácido nucleico dos respectivos genes *nifA*. As sequências das proteínas NifA foram alinhadas utilizando o programa Clustal (Higgins e Sharp, 1988) e os domínios definidos de acordo com Drummond et al., (1986). A homologia entre as proteínas foi calculada como descrito em Materiais e Métodos. Kp, *K. pneumoniae*; Rm, *R. meliloti*; RI, *R. leguminosarum* bv. *viciae*; e Ac, *A. caulinodans*

TABELA 8 - Plasmídeos derivados do pEMS108 com fusões
nifA::lacZ

Plasmídeo	Vetor	Característica
pEMS108	pSUP202	<u>nifA</u> intacto
pEMS109	pSUP202	<u>nifA::lacZ</u> , região promotora intacta
pEMS111	pBR322	<u>nifA::lacZ</u> , região promotora intacta
pEMS112	pBR322	<u>nifA::lacZ</u> , deleção do promotor dependente de NtrC

O plasmídeo pEMS108 foi construído clonando do fragmento Bam HI/Hind III de 8,3 kb do plasmídeo pEMS101 no vetor pSUP202. O plasmídeo pEMS109 foi obtido por mutagênese do plasmídeo pEMS108 com o transposon Tn5-B21. O transposon está inserido dentro do gene nifA e corretamente orientado. Os plasmídeos pEMS111 e pEMS112 foram obtidos clonando os fragmentos Pst I/Xho I de 6,3 kb e Nsi I/Xho I 4,3 kb do pEMS109, respectivamente, no vetor pBR322.

TABELA 9 - Ativação da expressão de fusões nifA::lacZ em E.coll

estirpe de <u>E. coli</u>	plasmídeo	ativ. de β -galactosidase	
		- NH_4^+	+ NH_4^+
ET8000 (w.t.)	pEMS109	452	104
ET8556 (<u>ntrC</u> ⁻)	pEMS109	74	105
ET8045 (<u>rpoN</u> ⁻)	pEMS109	59	63
ET8000 (w.t.)	pEMS109/pMM14	605	237
ET8556 (<u>ntrC</u> ⁻)	pEMS109/pMM14	413	248
ET8045 (<u>rpoN</u> ⁻)	pEMS109/pMM14	42	45
ET8000 (w.t.)	pEMS111	35	140
ET8556 (<u>ntrC</u> ⁻)	pEMS111	31	28
ET8000 (w.t.)	pEMS112	81	64
ET8556 (<u>ntrC</u> ⁻)	pEMS112	101	86
ET8000 (w.t.)	pEMS111/pMC71A	30	140
ET8556 (<u>ntrC</u> ⁻)	pEMS111/pMC71A	37	29
ET8000 (w.t.)	pEMS112/pMC71A	106	115
ET8556 (<u>ntrC</u> ⁻)	pEMS112/pMC71A	121	102

As estirpes de E. coli foram crescidas em meio mínimo suplementado com antibióticos e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de glutamina durante 18-24 horas em tubos fechados e a atividade de β -galactosidase foi determinada de acordo com Miller (183). A fonte de nitrogênio foi 20 mM de NH_4Cl (+ NH_4^+) ou 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de serina (- NH_4^+). A determinação de atividade de β -galactosidase foi feita em pelo menos dois experimentos diferentes e em duplicatas.

TABELA 10 - Distribuição de nucleotídeos (G + C) nos codons utilizados nos genes nifA e nifB de H. seropedicae

Posição no codon	% (G + C)		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
<u>nifA</u>	63	40	76
<u>nifB</u>	58	46	74
ORF1	67	43	77
Esperado (60%)	64	44	73

A percentagem de (G + C) nas três posições dos codons dos genes nifA e nifB de H. seropedicae, bem como da possível ORF1 foram calculadas a partir dos produtos de tradução. A percentagem esperada foi calculada de acordo com Bibb *et al.* (14).

TABELA 11 - Comparação do uso de codons de *H. seropedicae*, *A. brasiliense* e *E. coli*

Resíduo e codon	Hs	Ab	Ec	Resíduo e codon	Hs	Ab	Ec
	% de uso				% de uso		
Phe TTT	17	3	44	Tyr TAT	29	10	41
Phe TTC	83	97	56	Tyr TAC	71	90	59
Leu TTA	2	0	6	* TAA	0	25	88
Leu TTG	22	1	8	* TAG	0	0	4
Leu CTT	2	2	9	His CAT	47	9	39
Leu CTC	17	26	7	His CAC	53	91	61
Leu CTA	3	0	2	Gln CAA	32	3	27
Leu CTG	55	71	69	Gln CAG	68	97	73
Ile ATT	25	3	37	Asn AAT	35	9	24
Ile ATC	69	97	62	Asn AAC	65	91	76
Ile ATA	6	0	1	Lys AAA	21	2	77
Met ATG	100	100	100	Lys AAG	79	98	23
Val GTT	4	6	38	Asp GAT	42	4	51
Val GTC	37	54	13	Asp GAC	58	96	49
Val GTA	14	0	23	Glu GAA	55	28	73
Val GTG	46	40	27	Glu GAG	45	72	27
Ser TCT	0	2	27	Cys TGT	40	0	42
Ser TCC	25	31	26	Cys TGC	60	100	58
Ser TCA	6	0	8	* TGA	100	75	8
Ser TCG	33	47	11	Trp TGG	100	100	00
Pro CCT	6	0	9	Arg CGT	26	6	58
Pro CCC	36	16	6	Arg CGC	51	81	35
Pro CCA	9	0	20	Arg CGA	0	0	2
Pro CCG	48	84	65	Arg CGG	21	11	3
Thr ACT	13	2	24	Ser AGT	17	0	6
Thr ACC	69	76	51	Ser AGC	19	20	22
Thr ACA	3	2	6	Arg AGA	2	0	1
Thr ACG	16	20	20	Arg AGG	0	2	<1
Ala GCT	5	5	28	Gly GGT	18	15	48
Ala GCC	67	70	19	Gly GGC	66	82	41
Ala GCA	5	0	23	Gly GGA	6	0	5
Ala GCG	23	25	30	Gly GGG	10	3	7

Vide legenda na página seguinte.

A frequência de uso de codons para *H. seropedicae* foi calculada a partir da sequência dos genes nifA e nifB e de suas sequências de aminoácidos deduzidas. A frequência de uso de codons de *A. brasiliense* foi calculada de a partir da sequência dos genes glnA (19), nifH, parte do nifD (78) e hisA (79). A frequência de uso de codons de *E. coli* foi obtida de Konigsberg e Godson (158). Hs, *H. seropedicae*; Ab, *A. brasiliense* e Ec, *E. coli*.

4. DISCUSSÃO

Um banco genômico de Herbaspirillum seropedicae foi construído no cosmídeo vetor pVK102. O tamanho médio dos cosmídeos, revelado pela análise eletroforética de uma amostra do banco genômico, foi cerca de 102% do tamanho do genoma do fago lambda e, portanto, compatível com os limites teóricos esperados para a fase de empacotamento (172).

Este banco, contendo apenas 466 clones, foi utilizado para isolar o gene nifA. O banco em E. coli foi conjugado com o mutante nifA⁻ de A. brasiliense (FP10) e transconjugantes Nif⁺ foram selecionados em meio isento de nitrogênio fixado. A frequência de conjugação (Tabela 3) foi semelhante àquela obtida por Fani et al. (80) para o plasmídeo PRK290 (5×10^{-4}), plasmídeo base do vetor pVK102. A diferença, menor que uma ordem de grandeza, indicou que a presença de inserto e a nova construção do vetor não afetaram significativamente a frequência de conjugação. Três transconjugantes Nif⁺ foram isolados neste experimento. Estes, após perderem o plasmídeo recombinante por incompatibilidade com o plasmídeo R68.45, revertem ao fenótipo Nif⁻, demonstrando que o plasmídeo recombinante era o responsável pela complementação e que provavelmente continha o gene nifA de H. seropedicae. Um destes plasmídeos, denominado pEMS1, foi isolado e caracterizado.

A região do gene nifA de H. seropedicae foi delimitada

pela construção de diversos subclones do plasmídeo pEMS1 e pela capacidade de cada subclone em complementar o mutante FP10. Os fragmentos Sal I de 7,1, de 3,1 (2,0 + 1,0), de 2,0 ou de 1,0 kb não foram capazes de complementar o mutante FP10 quando clonados isoladamente. Por outro lado, o plasmídeo pEMS101 (pEMS1 deletado de fragmento Bam HI de 21 kb) complementou o mutante (figura 11 e tabela 6), indicando que o gene nifA provavelmente estaria localizado entre os fragmentos Sal I de 7,1 kb e de 2,0 kb. Esta região foi confirmada com a construção dos plasmídeos pEMS106 e pEMS107, ambos capazes de complementar o mutante FP10. Estes dois plasmídeos recombinantes contém como inserto o fragmento Cla I de 5,2 kb, mas posicionados em orientações opostas no vetor pVK102 (figura 11 e tabela 6). Este inserto muito provavelmente contém toda a região regulatória do gene nifA uma vez que ambos os plasmídeos complementam o mutante FP10.

Os resultados da subclonagem foram confirmados pelos experimentos de hibridização. Hibridização do plasmídeo pEMS101 com as três provas contendo o gene nifA mostram um sinal forte sobre o fragmento Sal I de 2,0 kb, indicando que a maior parte do gene nifA de *H. seropedicae* está localizada neste fragmento. O desaparecimento do sinal sobre o fragmento Pst I de 1,8 kb e Pst I/Bgl II de 1,7 kb com a prova C restringe a região do gene nifA ao fragmento Sal I/Pst I de 1,1 kb. Por outro lado, a persistência do sinal sobre o fragmento Sal I de 5,3 kb, sobre o fragmento Eco RI de 1,7 kb do plasmídeo pEMS101 e ainda sobre o fragmento Sal

I de 7,1 kb do plasmídeo pEMS1 com todas as três provas, indica que parte do gene nifA está localizado no fragmento Sal I de 7,1 kb do plasmídeo pEMS1 (5,3 kb do plasmídeo pEMS101), possivelmente extendendo-se até o fragmento Eco RI de 1,7 kb. A combinação dos dados de complementação genética com os dados de hibridização sugerem que o gene nifA de H. seropedicae está localizado em uma região de aproximadamente 2,0 kb do plasmídeo pEMS1 e que compreende parte do fragmento Sal I de 2,0 kb e parte do fragmento Sal I de 7,1 kb.

A ausência de banda autoradiográfica sobre o fragmentos Pst I de 1,8 kb, Pst I/Bgl II de 1,7 kb e Sal I de 1,0 kb com a prova C sugere ainda a presença adicional dos genes nifB ou nifL. O candidato mais provável seria o gene nifB uma vez que não há evidência do gene nifL em outro diazotrofo (121), com a possível exceção de A. vinelandii (9,12). Além disso, o forte sinal que aparece sobre os fragmentos Pst I de 1,8 kb e Pst I/Bgl II de 1,7 kb com as provas A e B, mas não com a prova C, é coerente com a presença da região N-terminal de nifB neste fragmento, uma vez que esta região é altamente conservada nas proteínas nifB de diferentes organismos (35,141). A diminuição da intensidade das bandas Eco RI de 2,0 kb e Bgl II de 2,3 kb com a prova C também é coerente com esta visão.

Os produtos dos genes ntrC e nifA possuem um alto grau de homologia e um pode substituir o outro na ativação da expressão de alguns promotores -24/-12. Por exemplo, a proteína NtrC pode substituir a NifA na ativação da

transcrição dos operons nifH e fixABCX de R. meliloti (257), enquanto que o inverso ocorre na ativação dos promotores hut e glnA (176). O plasmídeo pEMS1 foi então introduzido em mutantes ntrC⁻ de A. brasiliense estírpes FP9 e FP8 (214,215). O plasmídeo pEMS1, entretanto, não foi capaz de complementar estes mutantes, indicando a ausência de um gene homólogo a ntrC neste plasmídeo e que o gene nifA de H. seropedicae estava sob controle de seu próprio promotor, possivelmente regulado por NtrC como ocorre em K. pneumoniae (59,199).

Estes resultados sugerem que H. seropedicae possui um gene estruturalmente e funcionalmente semelhante ao gene nifA de K. pneumoniae, uma vez que o plasmídeo pEMS1 hibridiza com o gene nifA de K. pneumoniae e o mutante FP10, complementado pelo gene nifA de K. pneumoniae (pCK3, nifA^C) (214,215), também o é pelo plasmídeo pEMS1 e seus derivados pEMS101, pEMS106 e pEMS107.

Neste estágio, duas evidências sugeriam que o gene nifA de H. seropedicae fosse transscrito a partir do fragmento Sal I de 7,1 kb em direção ao fragmento Sal I de 2,0 kb: 1) o fragmentos Sal I de 7,1 kb e Eco RI de 1,7 kb hibridizavam fracamente com todas as provas utilizadas, indicando ser esta uma região de baixa homologia com o gene nifA de K. pneumoniae. A comparação das sequências dos genes nifA de vários organismos mostram que uma baixa homologia é compartilhada entre estas proteínas na região N-terminal, enquanto que a região central e C-terminal são altamente homólogas (60). A região N-terminal e do promotor, portanto,

estariam provavelmente localizados no fragmento Sal I de 7,1 kb, enquanto que a região central e C-terminal estaria localizada, em sua maior parte, no fragmento Sal I de 2,0 kb; e 2) a possível presença do gene nifB em parte do fragmento Sal I de 2,0 kb e extendendo-se para o fragmento de 1,0 kb. A disposição nifAnifB (nifA precedendo nifB), compreendendo um grupo nif isolado ou adjacente a outros genes nif, ocorre na maioria dos fixadores de nitrogênio (35,74,102,141,148,173). Considerando que possivelmente a mesma organização ocorra em H. seropedicae, a porção N-terminal do gene nifA estaria localizada no fragmento Sal I de 7,1 kb ou na sua proximidade.

Hibridização do DNA genômico de H. seropedicae com uma sonda contendo apenas o gene nifA de K. pneumoniae (sonda C), revelou a presença de dois sinalis sobre os fragmentos Sal I de 2,0 e Eco RI de 0,7 kb. Provavelmente estes fragmentos correspondem aos mesmos fragmentos presente no plasmídeo pEMS101 e que hibridizam com as provas contendo o gene nifA de K. pneumoniae. Além destes sinalis, apareceram vários outros que, aparentemente, não foram originados por hidrólise parcial do DNA, já que se trabalhou em condições para obter hidrólise total. O aparecimento destas várias bandas de DNA genômico de H. seropedicae homólogo ao gene nifA de K. pneumoniae, embora sob condições de baixa estringência, sugere a presença de mais de uma cópia do gene nifA em H. seropedicae, como ocorre em Azotobacter vinelandii (12,142), Azotobacter chroococcum (C. Kennedy, comunicação pessoal) e Rhodobacter capsulatus (173), ou a

presença de outros genes homólogos ao gene nifA, tais como os genes ntrG e dctD (2). Se várias cópias do gene nifA estiverem presentes em H. seropedicae deve haver diferenças entre suas sequências já que a intensidade das bandas é variável. Em A. vinelandii existem pelo menos três diferentes genes nifA e dois deles estão relacionados com as nitrogenases alternativas (12,142). Por outro lado duas diferentes porções de DNA contendo os genes nifA e nifB estão presentes no genoma de R. capsulatus, os quais são praticamente idênticos (173). Também em Rhizobium leguminosarum bv phaseoli a presença do gene nifA foi mapeada em duas regiões diferentes do plasmídeo simbótico (Palacios, comunicação pessoal). A presença de mais que uma cópia do gene nifA pode ser devido a uma alta demanda da enzima nitrogenase.

Apesar destes casos precedentes, a hipótese da presença de uma família de genes homólogos ao gene nifA parece mais provável. Neste caso um grau variável de homologia seria esperado, refletindo-se em intensidades variáveis das bandas. Além disso, evidências crescentes indicam que a proteína NtrG faz parte de uma família de proteínas regulatórias, capazes de ativar a transcrição de promotores do tipo -24/-12, e que compartilham um elevado grau de homologia com a proteína NifA nos domínio central e C-terminal (2,52,60,160). Apesar desta homologia, as evidências sugerem que a proteína NifA não faz parte desta família pois apresenta grandes diferenças estruturais, principalmente no domínio N-terminal. Além disto, apenas em

K. pneumoniae foi documentado seu par, a proteína NifL, e a forma de interação NifA-NifL aparentemente não envolve fosforilação/desfórmilação, como nos demais componentes daquela família (5,52,61).

Hibridização do DNA genômico de *H. seropedicae* digerido com Eco RI com uma sonda contendo os genes nifHDK de *R. leguminosarum* bv phaseoli produz uma banda de 7,1 kb e uma de 1,2 kb (figura 17). Como os genes nifHDK são altamente conservados entre os diversos diazotrofos estudados (62, 234), este resultado não foi uma surpresa. O plasmídeo pEMS1, ao contrário, não hibridizou com os genes nifHDK. Além disso os mutantes, FP3 (nifHDK⁻) e FP6 (que não produz a dinitrogenase) não são complementados pelo plasmídeo pEMS1. Supondo que os genes nif estivessem organizados em *H. seropedicae* de forma semelhante aos de *K. pneumoniae* haveria um espaço de cerca de 27 kb para outros genes nif no inserto do plasmídeo pEMS1. Estas evidências fornecem um primeiro indício de que os genes nif de *H. seropedicae* estão organizados de forma diferentes daquela de *K. pneumoniae* ou melhor, que os genes nifAnifB não estão nas proximidades dos genes nif estruturais da nitrogenase. Em *A. brasiliense* evidências recentes indicam que o gene nifB também está localizado fora do agrupamento nif principal (95).

Após a localização da provável região que contém o gene nifA no plasmídeo pEMS101, os fragmentos Sal I de 2,0 kb e Eco RI de 1,7 kb foram clonados nos plasmídeos pTZ18R e pTZ19R, respectivamente, e sequenciados completamente em ambas as direções. A região que liga os fragmentos Sal I e

Eco RI também foi sequenciada utilizados os plasmídeos pEMS304 e pEMS305. A pequena diferença de tamanho entre as deleções (≈ 200 bp) permitiu que a maioria das bases fosse lida pelo menos em duas corridas diferentes em cada direção, facilitando a detecção de erros de leitura e discrepâncias de migração causadas pela formação de estruturas secundárias, principalmente em regiões de alto conteúdo (G + C).

A ORF completa encontrada na região sequenciada possui uma sequência consenso para sítio de ligação ao ribosomo (245), codifica para uma proteína de peso molecular similar ao de outras proteínas NifA (36,60,102) e sua localização está em concordância com os experimentos de hibridização anteriores. De fato, a proteína deduzida desta ORF apresentou um alto grau de homologia com a proteína NifA de Rhizobium meliloti (36), Rhizobium leghuminosarum bv. viciae (102), Azorhizobium caulinodans (192) e K. pneumoniae (36,60). Esta homologia, porém, é mais acentuada com a proteína NifA de A. caulinodans e, em menor grau, com a de R. meliloti e R. leghuminosarum do que com a de K. pneumoniae (tabela 7) e restringe-se quase que exclusivamente aos domínios D e E (figura 25).

Devido ao baixo grau de homologia, a definição de dois domínios (A e C) na região N-terminal das proteínas NifA pelo critério de similaridade, como proposto por Drummond et al. (60), torna-se cada vez mais difícil a medida que se aumenta o número de proteínas NifA comparadas. Além disso tem-se reportado que a proteína NifA de R. meliloti deletada de sua porção N-terminal ainda é capaz de ativar a

transcrição de promotor -24/-12 (133). Estes dados sugerem que a região N-terminal da proteína NifA não tem função essencial para sua atividade, contribuindo, possivelmente, para manter sua estabilidade ou sua conformação.

A proteína NifA de H. seropedicae possui na sua região C-terminal uma estrutura α -hélice-volta- α -hélice (domínio E), homóloga àquela de outras proteínas NifA. Esta estrutura supostamente funciona como um sítio de ligação para DNA (60). Na proteína NifA de H. seropedicae ocorre substituição de um resíduo de glicina por um resíduo de asparagina na posição 9 deste motivo. A presença de um resíduo volumoso nesta posição poderia distorcer a volta, produzindo um sítio de ligação de DNA anômalo (201). Por outro lado a mesma substituição foi encontrada na proteína NifA de A. caulinodans (192) e, em R. meliloti (36), onde um resíduo de ácido glutâmico está presente nesta posição. Em todos estes casos a proteína NifA exibe atividade fisiológica. A proteína NifA de R. meliloti requer UAS para ativação do promotor nifH de K. pneumoniae (188), confirmando sua capacidade de se ligar diretamente ao DNA e sugerindo que outros resíduos de aminoácidos além do de glicina podem ser acomodados nesta posição sem causar a distorção completa do sítio de ligação de DNA.

Um interdomínio localizado entre os domínios D e E está presente na proteína NifA de H. seropedicae, de Rhizobium (36,102), Bradyrhizobium japonicum (86) e A. caulinodans (192) mas não em K. pneumoniae (36,60) e Azotobacter vinelandii (12). Este interdomínio contém dois resíduos de

cisteína essencialmente conservados naquelas proteínas NifA, os quais, junto com dois outros resíduos de cisteína localizados no final do domínio D, determinam uma estrutura semelhante a um sítio de ligação de metal (86). Com exceção desses resíduos de cisteína e de algumas substituições conservativas, a homologia entre as proteínas NifA das diversas espécies não é alta. Tal sítio tem sido considerado como um potencial sensor de níveis de oxigênio e modulador da atividade da proteína NifA (86). Sob condições de baixas concentrações de oxigênio o metal ligado estaria reduzido e estabilizaria a proteína NifA em sua conformação ativa; sob condições de altos níveis de oxigênio, ao contrário, o metal ligado se oxidaria alterando a conformação da proteína NifA e, portanto, impedindo a ativação da transcrição de genes nif (86). A substituição destes resíduos de cisteína, um de cada vez, por resíduos de serina na proteína NifA de Bradyrhizobium japonicum por mutagênese com oligonucleotídeos, aboliu completamente sua atividade. E mais, a adição de quelantes de metais, tal como a α -fenantrolina, inibe a ativação de transcrição de genes nif promovida pela proteína NifA de B. japonicum e, menos acentuadamente, de R. meliloti, enquanto que estes mesmos quelantes não exercem nenhum efeito sobre a atividade da proteína NifA de K. pneumoniae (86). Recentemente foi demonstrado que a proteína NifA de B. japonicum é sensível a altos níveis de oxigênio, enquanto que as de K. pneumoniae (87) ou A. vinelandii (8) são insensíveis. Apesar das evidências relacionando este interdomínio com a

sensibilidade da proteína NifA ao oxigênio ainda não serem definitivas, sua presença na proteína NifA de *H. seropedicae* sugere que sua atividade possa ser controlada em decorrência de flutuações nos níveis de oxigênio.

Uma vez que não há evidência para um gene semelhante ao gene nifL em *H. seropedicae*, é interessante especular se NH_4^+ , como sugerido para o oxigênio, não poderia agir diretamente sobre a proteína NifA de *H. seropedicae* fornecendo, além do controle via sistema ntr, um segundo nível de controle transcripcional por nitrogênio.

Precedendo em aproximadamente 100 pb do sítio de início de tradução do gene nifA de *H. seropedicae* foram encontradas 3 sequências identificadas como potenciais promotores -24/-12. Um sítio de ligação para NifA (UAS) também foi encontrado precedendo em 257 pb o início de tradução. Este arranjo, promotor -24/-12 precedido em cerca de 100 pb por um sítio de ligação para NifA, é típico de promotores nif ativados por NifA e que requerem RpoN como fator sigma (52,104). Entretanto, a maioria dos promotores nifA sequenciados não apresentam um sítio de ligação para NifA (36,60,102,258). Apesar disso uma melhor análise dos dados de sequência e estudos de expressão do gene nifA mostram a importância de seu produto como autoativador em uma variedade de organismos. O operon nifLA de *K. pneumoniae* tem um UAS localizado depois do início de transcrição, o qual é necessário para a ativação da transcrição do gene nifE em sentido contrário, sendo ainda necessário para a completa ativação da transcrição do operon nifLA pela proteína NifA.

(184). Em *A. caulinodans* um possível sítio de ligação para NifA (UAS) foi identificado precedendo o promotor -24/-12 do gene nifA (192). Na região intercistrônica do operon fixRnifA de *R. japonicum* foi identificado uma sequência UAS, mas não precede um promotor -24/-12. Entretanto, precedendo o início de tradução do gene fixR existe uma sequência consenso ao promotor -24/-12 e um hemi-sítio para ligação de NifA separados entre si por aproximadamente 100 pb (258). Resultados iniciais utilizando fusões fixR::lacZ e nifA::lacZ indicaram que o produto do gene nifA não era importante para a expressão deste operon (258). Entretanto, a utilização de fusões fixR::lacZ integradas em partes não essenciais do cromosoma de *R. japonicum* demonstrou que a proteína NifA é capaz de ativar, embora discretamente, a transcrição do operon fixRnifA de *R. japonicum* (259). Finalmente, o promotor do gene nifA de *R. meliloti* não apresenta sítio de ligação para a proteína NifA (36). Posteriormente foi demonstrado que este promotor responde a uma outra proteína ativadora, FixJ (47,153). Porém, uma vez sintetizada a proteína NifA ativa a transcrição do operon fixABCX, que precede imediatamente o gene nifA. Cerca de 70% dos transcritos iniciados naquele operon contém o gene nifA, caracterizando portanto uma autoativação (154).

A presença de promotor -24/-12 e o espaçamento correto em relação a UAS e ao início de transcrição são evidências que sugerem fortemente que a proteína NifA ativa a transcrição do gene nifA em *H. seropedicae*. Um fator complicante, sem dúvida, é a presença de 3 sequências que

concordam, em graus variáveis, com a sequência consenso de promotor -24/-12. A presença de vários destes promotores em sequência poderia ser devido a uma elevada demanda pela proteína NifA. Esta idéia porém não parece provável uma vez que NifA é uma proteína regulatória. É possível especular se promotores com menor afinidade poderiam ter uma função regulatória na expressão do gene nifA de H. seropedicae. Estes poderiam, por exemplo, interagir com a RNAPolimerase- σ^{54} sob condições proibitivas de amônia e/ou oxigênio formando complexos fechados inefetivos para a transcrição, diminuindo ou bloqueando assim a expressão gênica. A formação de complexos fechados com promotores de baixa afinidade em condições de repressão poderia inclusive ser mediada pela proteína NifA ligada a UAS. Evidências recentes sugerem que a proteína NifA pode estabilizar a formação do complexo RNAPolimerase- σ^{54} /promotor -24/-12 (187). Pode-se especular que no caso da estabilização de complexo fechado com promotor de baixa afinidade pela proteína NifA, a catálise da passagem para o complexo aberto e início de transcrição não ocorreria, possivelmente devido à interação entre a proteína NifA e a molécula repressora (NH_4^+ e/ou O_2^-).

É possível ainda que o sítio de ligação para NifA (UAS) localizado na posição 1269 esteja relacionado com a ativação da transcrição de um gene nif em direção oposta a direção de transcrição do gene nifA. A identificação de sequências similares à sequência de promotor -24/-12 (GG-N₁₀-GC) na região entre as posições 880 e 944, em orientação oposta ao

gene nifA favorece esta hipótese. Além disto, a análise pelo métodos de uso preferencial de codons sugere a existência de uma ORF transcrita em direção contrária ao gene nifA (figura 24). Entretanto, a distância entre o suposto início de tradução e a UAS é muito grande (aproximadamente 500 pb). Em *K. pneumoniae* o gene nifF está localizado adjacente ao gene nifA, porém é transcrito em sentido contrário e o sítio de ligação para NifA está localizado 263 pb antes do início de transcrição (33). Todos os possíveis produtos de tradução, nas duas direções, da região que precede o gene nifA (posições 1-1200) de *H. seropedicae* foram comparados com os bancos de dados EMBL e Genebank, mas nenhuma homologia conclusiva foi encontrada. A construção de fusões transpcionais lacZ em diversos pontos daquela região e o estudo de sua expressão poderia esclarecer esta questão.

Um sítio de ligação para a proteína NtrC e um promotor -12/-24 foram encontrados precedendo o primeiro codon em 505 pb e 407 pb, respectivamente. A presença destas estruturas sugere uma possível função de NtrC na ativação da transcrição do gene nifA de *H. seropedicae*. Os resultados com as fusões nifA::lacZ (tabela 9) mostram que a proteína NtrC é capaz de ativar, apesar de fracamente, a transcrição do gene nifA em *E. coli*, implicando na existência de um gene homólogo ao gene ntrC em *H. seropedicae*. É interessante notar ainda que o gene nifA de *H. seropedicae* não complementa os mutantes ntrC⁻ de *A. brasiliense*.

Os dados estruturais complementados pelos dados fisiológicos sugerem que a transcrição do gene nifA de *H.*

H. seropedicae tem pelo menos dois pontos de início de transcrição. Os promotores -24/-12 ativáveis por NtrC e por NifA aparentemente dirigem a síntese de duas espécies distintas de mRNA e possivelmente são regulados independentemente. Sob condições de baixos níveis de nitrogênio fixado a proteína NtrC ativaría a transcrição do gene nifA e assim também faria o seu produto de tradução (NifA) desde que os níveis de oxigênio e amônia assim o permitissem, estabelecendo um ciclo de autoativação. Em condições de altos níveis de oxigênio a proteína NifA poderia bloquear ou diminuir a velocidade de transcrição do gene nifA. Este efeito poderia ocorrer hipoteticamente de duas maneiras: a) A proteína NifA poderia ser diretamente inativada por oxigênio, interrompendo o ciclo de autoativação de forma semelhante àquela formulada para H. japonicum; e b) A proteína NifA poderia sofrer uma mudança conformacional induzida por oxigênio, alterando sua atividade fisiológica. Esta mudança impossibilitaria a proteína NifA de catalisar a formação do complexo aberto, mas ainda permitiría a formação de um complexo fechado estável inclusive com os promotores de mais baixa afinidade. Em A. caulinodans a expressão do gene nifA aparentemente é autoregulada negativamente sob condições não simbióticas de fixação de nitrogênio, fornecendo um precedente de regulação negativa pela proteína NifA (24).

Por outro lado, convém ressaltar que as fusões transpcionais do gene nifA de H. seropedicae com lacZ não respondem ao produto do gene nifA de K. pneumoniae em E.

coll. Este resultado inesperado, contudo, ainda não pode ser conclusivo. Em primeiro lugar diferenças na maquinaria bioquímica de transcrição e tradução entre H. seropedicae e E. coli poderiam impedir a deteção da atividade da proteína NifA. Além disso as fusões lacZ utilizada foram construídas em vetor de múltiplas cópias, que são inadequados para a visualização de variações discretas na atividade de ativação de transcrição (compare, por exemplo, 258 e 259). Fusões lacZ cromosomais em H. seropedicae ou em plasmídeo vetor de 1-2 cópias por cópia de cromosoma serão necessárias para o perfeito esclarecimento do papel autoregulador da proteína NifA. Por outro lado, é necessário notar ainda que, dado a provável ação dos níveis de oxigênio sobre a expressão do gene nifA de H. seropedicae, as condições de oxigenação deveriam ser rigorosamente controladas.

A presença de promotores -24/-12 na região promotora do gene nifA sugeria ainda que sua expressão requer o produto do gene rpoN. Esta implicação foi confirmada pelos ensaios de ativação da fusão HsnifA::lacZ (pEMS110) em E. coli, que demonstram o requerimento absoluto para do gene rpoN na expressão do gene nifA de H. seropedicae. Este fato implica na existência de um gene homólogo ao gene rpoN em H. seropedicae.

Uma possível sequência "anaerobox" foi identificada dentro da região codificadora do gene nifA de H. seropedicae. Tal estrutura possui apenas duas substituições de bases em relação à sequência consenso. A presença de sequência "anaerobox" sugere a existência de um gene

homólogo ao gene fnr de E. coli em H. seropedicae. O produto do gene fnr de E. coli participa do controle da expressão de proteínas do metabolismo anaeróbico (244). Uma função ativadora é atribuída à sequência "anaerobox" localizada antes ou sobreposta ao início de transcrição enquanto que quando localizada na região codificadora (ORF) possui uma função repressora (192). Dentro da região codificadora do gene nifD de B. japonicum uma sequência "anaerobox" também foi identificada (192). Em R. meliloti a expressão do gene nifA é controlada pelos produtos dos genes fixL e fixJ e é reprimida pelo produto do gene fixK em condições de altos níveis de oxigênio (11,47,153). A expressão do gene fixK é autoregulada negativamente. A comparação da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene fixK, com a proteína FnR mostrou um elevado grau de homologia (11). Aparentemente a proteína FixK reconhece uma sequência homóloga à sequência "anaerobox" (11). Assim, por comparação, as estruturas regulatórias identificadas sugerem que a expressão do gene nifA de H. seropedicae sofreria um controle negativo pelos níveis de oxigênio. Desta forma a expressão do gene nifA estaria regulada pela concentração de oxigênio em dois níveis: a) a nível de atividade da proteína NifA; e b) a nível de uma proteína homóloga a FnR ou FixK, reagindo diretamente a altas concentrações de oxigênio bloqueando a transcrição do gene nifA. Também em K. pneumoniae o controle da expressão dos genes nif por oxigênio ocorre em pelo menos dois níveis. Em primeiro lugar, em concentrações de oxigênio acima de 6 μ M a proteína

NifA é diretamente inativada pela proteína NifL, impedindo a ativação dos operons nif, inclusive sua autoativação (39). Além disso NifL desestabilizaria os transcritos nif nestas condições (45). Em concentrações superiores de oxigênio, maiores que 60 μ M, a expressão do operon nifLA é reprimida, aparentemente devido a uma diminuição do grau de superenrolamento do DNA (54). O controle da expressão do gene nifA, e por consequência dos genes nif, em mais de um nível respondendo às diferentes concentrações de oxigênio, aparentemente garante que a nitrogenase não será sintetizada sob condições nas quais é inoperante.

Além destas estruturas a sequência do gene nifA de H. seropedicae possui em sua região promotora uma estrutura que concorda com uma sequência de ligação do fator de integração do hospedeiro (IHF). Esta estrutura está precede em aproximadamente 40 pb o sítio de ligação para NifA. IHF é uma proteína de E. coli que tem uma função importante durante a integração do DNA do bacteriófago lambda no cromosoma, participando diretamente desta evento de recombinação (89). Esta proteína aparentemente possui outras funções em E. coli tais como o participação no empacotamento do DNA viral nos capsídeos, iniciação de replicação de plasmídeos, transposição de transposons e controle da expressão gênica (89). A proteína IHF tem a capacidade de se ligar a uma sequência específica de DNA causando seu dobramento. Experimentos de interferência da metilação de bases na ligação de IHF ao DNA e de proteção do DNA do ataque de radicais hidroxila demonstram que a interação da

proteína IHF com sua sequência de ligação ocupa uma extensão de pelo menos 25 pb (41). Por outro lado, experimentos de proteção da digestão por DNase I mostraram que o IHF protege uma extensão de até 50 pb com um centro aproximado na sequência consenso ATCAA (41). A proximidade do sítio de ligação de NifA do sítio de ligação do IHF poderia levar a uma competição entre NifA e IHF, uma vez que a ligação de IHF ao seu sítio provavelmente provocaria uma mudança de conformação do DNA em sua vizinhança. A competição entre NifA e IHF poderia modular ou regular a expressão do gene nifA de H. seropedicae. Em K. pneumoniae existe um sítio de ligação para IHF entre o promotor -24/-12 do gene nifH e a UAS e a atividade da proteína NifA na ativação do promotor nifH de K. pneumoniae é estimulada pela presença de IHF (239). A região do promotor do gene nifU de K. pneumoniae também possui um sítio de ligação entre as suas 3 UAS's e o promotor -24/-12 e, como ocorre no promotor nifH, a sua atividade também é estimulada pela presença de IHF (M. Buck e W. Cannon, comunicação pessoal). Isto ocorre possivelmente devido a sua habilidade em dobrar a fita de DNA facilitando o contato entre o promotor e NifA ligado a UAS (239). Entretanto, resultados de proteção de metilação "in vivo" sugerem competição entre NifA e IHF pela ocupação da UAS3 e ainda que IHF protege a região de UAS3 do promotor -24/-12 do gene nifU (M. Buck e W. Cannon, comunicação pessoal), assim IHF poderia funcionar como um modulador da atividade de alguns promotores nif..

Nenhum sítio de terminação rho-independent (217) foi

Identificado antes ou depois do gene nifA, sugerindo que a terminação do transcrito nifA é dependente de fator proteíco. A hibridização do fragmento Sal I/Bgl II de 0,4 kb, contendo apenas sequência da região codificadora do gene nifA, com RNA total de A. brasiliense FP10 (pEMS107) mostra um transcrito principal de aproximadamente 1,8 kb, indicando que contém apenas o gene nifA. O mapeamento de tamanho de transcrito do gene nifA em H. seropedicae não foi possível pois a quantidade de RNA nif obtida foi insuficiente.

A cerca de 300 pb abaixo do gene nifA, a porção N-terminal de uma outra ORF foi identificada, a qual compartilha extensa homologia com a porção N-terminal da proteína NifB de B. japonicum (196) e A. vinelandii (141). Este resultado está de acordo com os experimentos preliminares de hibridização que indicavam a presença do gene nifB ou nifL naquela região. O agrupamento de resíduos de cisteína presente na região N-terminal da proteína NifB de H. seropedicae é bastante conservado entre as três proteínas comparadas. Este agrupamento tem a função hipotética de ligar metal durante o processamento ou durante a síntese do cofator de ferro e molibdênio (FeMoco). É interessante notar ainda que a homologia do N-terminal da proteína NifB de H. seropedicae é maior com a de B. japonicum (68%) e A. vinelandii (66%) do que com a de K. pneumoniae (53%).

Na maioria dos diazotrofos o gene nifB está localizado adjacente ao gene nifA, na ordem nifAnifB, juntos a um agrupamento de genes nif ou como um grupo separado. Os

resultados de sequência, de hibridização e de complementação genética mostraram que estes dois genes também estão juntos em *H. seropedicae*, mas possivelmente localizados separadamente do genes nif estruturais.

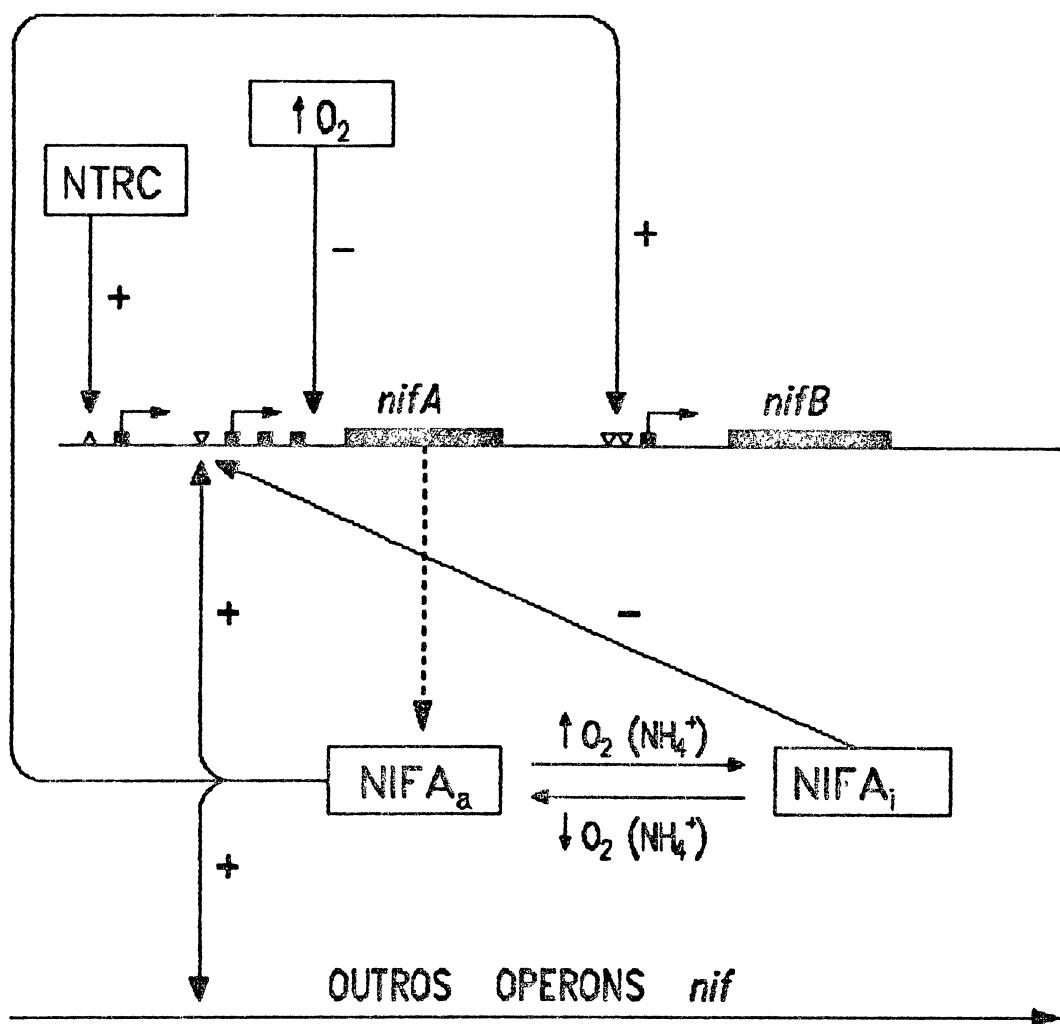
A presença de um promotor -24/-12 precedendo o gene nifB implica que sua transcrição, e possivelmente a de outros genes nif de *H. seropedicae*, requer o fator σ^{54} (RpoN). A presença adicional de 2 sítios de ligação para NifA a cerca de 60 pb do promotor -24/-12 implica ainda na dependência do produto do gene nifA para a ativação da transcrição do gene nifB. Esta última implicação reforça a sugestão de que proteína NifA realmente atua como um ativador específico dos genes nif também em *H. seropedicae*. Dois sítios de ligação para NifA na região promotora do gene nifB foram reportados também em *R. meliloti* (35) e *A. vinelandii* (141), os quais podem estar envolvidos em um controle fino de transcrição ou ainda podem agir estimulando a atividade do promotor por meio de um aumento da disponibilidade da proteína NifA nas imediações do promotor. O promotor do gene nifL, por exemplo, exibe 2 sítios de ligação para a proteína NtrC, embora ambos de baixa homologia com a sequência consenso (59). Cada um de tais sítios, porém, interagem com um dímero da proteína NtrC cooperativamente (6).

A percentagem de (G + C) de 60% obtida da região sequenciada está em concordância com o conteúdo global (G + C) de *H. seropedicae*. A preferência de uso de codons é claramente diferenciada daquela de *E. coli* (tabela 11).

Quando comparado com A. brasiliense, a tendência na utilização de codons nos genes nifA e nifB de H. seropedicae é parcialmente conservada, mas não possui um desvio tão acentuado quanto notado em genes daquele organismo (19,78,79). Somente 3 codons (além dos codons de terminação TAA e TAG) não foram utilizados em nenhuma circunstância nos genes nifA e nifB de H. seropedicae. Entre codons sinônimos terminados em A ou T, ocorre uma ligeira preferência pelos terminados em T: entre oito casos, em 4 ocorre a preferência pelos terminados em T (Ile, Thr, Arg e Gly), em 2 pelos terminados em A (Val e Ser) e em 3 as frequências são semelhantes para ambas as terminações (Leu, Pro, e Ala). Ainda como em A. brasiliense, ocorre uma preferência no uso de G ou C na terceira posição do codon utilizados nas proteínas NifA e NifB de H. seropedicae, provavelmente decorrente do alto conteúdo (G + C). Esta tendência também não é tão acentuada como em A. brasiliense. Globalmente as diferenças no uso de codons entre A. brasiliense e H. seropedicae são bastante significativas indicando que estas duas bactérias não são tão próximas como se pensava. De fato hibridização RNA/RNA mostraram que a homologia entre os gêneros Azospirillum e Herbaspirillum é baixa (76).

Os resultados apresentados neste trabalho sobre a estrutura e regulação do gene nifA de H. seropedicae permitem a construção de um modelo preliminar para a regulação da fixação de nitrogênio neste organismo, que está apresentado na figura 36. Inicialmente este modelo prediz a existência em H. seropedicae de genes homólogos aos genes

FIGURA 36 - MODELO PROPOSTO PARA A REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÉNIO EM *H. seropedicae*



Sob baixas concentrações de amônia a proteína NtrC ativa a transcrição do gene *nifA*. Sob baixas concentrações de oxigênio e/ou amônia, a proteína NifA ativa os promotores dos operons *nif*, inclusive o próprio promotor *nifA*, enquanto que em altas concentrações de oxigênio e/ou amônia, a proteína NifA perde sua capacidade de ativador de transcrição. Altas concentrações de oxigênio inibem ainda a transcrição do gene *nifA*, via uma proteína homóloga a FixK, atuando na sequência "anaerobox" do gene *nifA*. Símbolos: Δ , sítio de ligação para NtrC; ∇ , sítio de ligação para NifA; \blacksquare , promotor -24/-12. A seta pontilhada indica o produto do gene. A seta contínua indica ativação (+) ou inibição (-) de transcrição.

rpoN e ntrC de E. coli e K. pneumoniae, e aos genes fnr de E. coli ou fixK de R. meliloti. A proposição pressupõe basicamente que a expressão do gene nifA seria ativada pela proteína NtrC em baixas concentrações de nitrogênio fixado e que proteína NifA, uma vez sintetizada, ativaría a expressão do gene nifB bem como de outros operons nif, inclusive do gene nifA. Este modelo prediz ainda que a proteína NifA poderia existir em duas formas: sob condições de baixas concentrações de O_2 e/ou NH_4^+ ocorreria em uma forma ativa, capaz de ativar a transcrição de genes nif, enquanto que em altas concentrações de O_2 e/ou NH_4^+ ocorreria em uma forma inativa. Especula-se ainda que na forma inativa a proteína NifA poderia atuar negativamente sobre os promotores -12/-24 do gene nifA, bloqueando sua transcrição. A presença de uma estrutura homóloga a "anaerobox" na região codificadora do gene nifA sugere ainda que altas concentrações de oxigênio bloquearia a transcrição do gene nifA via uma proteína homóloga a Fnr de E. coli ou FixK de R. meliloti.

Adicionalmente estes resultados sugerem que a regulação da fixação de nitrogênio em A. brasiliense é semelhante a de H. seropedicae. Esta observação vem do fato de que o mutante nifA⁻ de A. brasiliense FP10 ser complementado pelo gene nifA de H. seropedicae, implicando portanto, que o sistema de ativação do gene nifA de H. seropedicae funcione em A. brasiliense. As condições mínimas para que isto ocorra seria a existência em A. brasiliense de genes homólogos aos genes ntrC e rpoN, o que corrobora os dados de Pedrosa e Yates

(214,215) que postulou a presença destes mesmos genes em *A. brasiliense*.

É interessante notar ainda que expressão do gene nifA de *H. seropedicae* é semelhante àquela do gene nifA de *K. pneumoniae* quando depende de NtrC ou NifA, e requer RpoN. Por outro lado a proteína NifA deduzida da sequência de nucleotídeos apresenta uma homologia maior com as proteínas NifA de *A. caulinodans* e *Rhizobium* spp. do que com a de *K. pneumoniae*. A análise destes resultados em termos de regulação da fixação de nitrogênio (figura 36) produz um quadro intermediário entre aquele que ocorre em um organismo simbótico (*R. meliloti*) e em um organismo de vida livre (*K. pneumoniae*). Nesta mesma linha de raciocínio é interessante notar também que a porção N-terminal da proteína NifB possui um grau de homologia maior com aquela de *B. japonicum* do que com a de *K. pneumoniae*. Estes dados sugerem que *H. seropedicae*, e provavelmente *A. brasiliense*, estão evolutivamente localizados entre os bacilos Gram negativos fixadores de nitrogênio de vida livre e aqueles simbóticos.

5. CONCLUSÕES

1. Herbaspirillum seropedicae possui um gene nifA, homólogo a outros genes nifA descritos. Dada a semelhança estrutural da proteína NifA codificada por este gene com aquelas de outros organismos e a capacidade de complementar o mutante regulatório FP10 de A. brasiliense (nifA⁻), propomos que o produto deste gene atua como um ativador de transcrição dos genes nif em H. seropedicae.
2. A proteína NifA de H. seropedicae possui um Interdomínio D-E homólogo àquele presente nas proteínas NifA de Bradyrhizobium japonicum, Rhizobium spp. e Azorhizobium caulinodans. Em B. japonicum e Rhizobium meliloti este Interdomínio está aparentemente envolvido com a sensibilidade ao oxigênio da proteína NifA. Propomos que a atividade da proteína NifA de H. seropedicae seja também controlada por oxigênio, atuando nesta região da proteína.
3. A transcrição do gene nifA de H. seropedicae é ativada pela proteína NtrC e, provavelmente, também pela proteína NifA, requerendo como fator sigma para a RNAPolimerase a proteína RpoN. A presença de uma sequência similar a uma "anaerobox" sugere ainda que a

expressão do gene nifA depende também da concentração de oxigênio.

4. A região N-terminal do gene nifB de H. seropedicae, presente após o gene nifA e transcrita na mesma direção, exibe um sítio de ligação de metais homólogo ao de proteínas NifB de outros organismos. Provavelmente o produto do gene nifB de H. seropedicae possui função homóloga ao de Klebsiella pneumoniae na biosíntese do cofator FeMoco.
5. O promotor do gene nifB exibe característica típica de promotores nif. A presença de 2 sequências UAS precedendo o promotor -24/-12 do gene nifB implica na função ativadora da proteína NifA, reforçando a proposição de que NifA atua como um ativador da expressão de genes nif.
6. Os resultados apresentados indicam que a regulação da expressão do gene nifA de H. seropedicae é similar àquela que ocorre em K. pneumoniae. Entretanto as proteínas NifA e NifB de H. seropedicae tem maior relação com as proteínas NifA de A. caulinodans e NifB de H. japonicum, sugerindo que H. seropedicae está evolutivamente situado entre os organismos de vida livre e simbóticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGUILAR, M.D., REILÄNDER, H., ARNOLD, W. e PÜHLER, A. *Rhizobium meliloti nifN (fixE)* gene is part of an operon regulated by a *nifA*-dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to *nifK* gene product. *J. Bacteriol.*, 169:5393-400, 1987.
- 2 ALBRIGHT, L.M., HUALA, E. e AUSUBEL, F.M. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu. Rev. Genet.*, 23:311-36, 1989.
- 3 AMERSHAM INTERNATIONAL. Membrane transfer and detection methods. England, s.ed., 1985. 56p.
- 4 ARNOLD, W., RUMP, A., KLIPP, W., PRIEFER, U.B. e PÜHLER. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.*, 203:715-38, 1988.
- 5 ARNOTT, M., SIDOTTI, C., HILL, S. e MERRICK, M. Deletion analysis of the nitrogen fixation regulatory gene, *nifL* of *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.*, 151:180-2, 1989.
- 6 AUSTIN, S., HENDERSON, N. e DIXON, R.A. Requirements for transcriptional activation "in vitro" of the nitrogen-regulated *glnA* and *nifLA* promoters from *Klebsiella pneumoniae*: dependence on activator concentration. *Mol. Microbiol.*, 1:92-100, 1987.

- 7 BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L. e DÖBEREINER, J. Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol., 36:86-93, 1986.
- 8 BALI, A., HILL, S., SANTERO, E., TOUKDARIAN, A., WALMSLEY, J e KENNEDY, C. NifA and NtrC activate separate nitrogen fixation pathways in Azotobacter. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen Fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fisher, 1988. p.316.
- 9 BALI, A. e KENNEDY, C. Mutations in a nifL-like gene upstream of nifA in Azotobacter vinelandii result in molybdenum nitrogenase expression in the presence of ammonia and in the absence of molybdenum. Livro de resumos do 8th International Congress on Nitrogen Fixation. E 93.
- 10 BANKIER. A.T., WESTON, K.M. e BARREL, B.G. Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method. Methods Enzimol., 155:51-93, 1987.
- 11 BATUT, J., DAVERAN-MINGOT, M.-L., DAVID, M., JACOBS, J., GARNERONE, A.M. e KAHN, D. fixK, a gene homologous with fnr and cre from Escherichia coli, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in Rhizobium meliloti. EMBO J., 8:1279-86, 1989.
- 12 BENNET, L.T., CANNON, F. e DEAN, D.R. Nucleotide sequence and mutagenesis of the nifA gene from Azotobacter vinelandii. Mol. Microbiol., 2:315-21, 1988.

- 13 BEYNON, J., CANNON, M., BUCHANAN-WOLLASTON, V. e CANNON, F. The nif promoters of Klebsiella pneumoniae have a characteristic primary structure. Cell, 34:665-71, 1983.
- 14 BIBB, M.J., FINDLAY, P.R. e JOHNSON. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. Gene, 30:157-66, 1984.
- 15 BISHOP, P.E., JARLENSKI, D.M.L. e HEATHERINGTON, D.R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in Azotobacter vinelandii. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:7342-6, 1980.
- 16 BISHOP, P.E., JARLENSKI, D.M.L. e HEATHERINGTON, D.R. Expression of an alternative nitrogen fixation system in Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol., 150:1244-51, 1982.
- 17 BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICALS. Biochemicals for molecular biology. Mannheim, s.ed., 1987. 172p.
- 18 BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICALS. Genius nonradioactive DNA labelling and detection kit. Indianapolis, s.ed. n.p.
- 19 BOZOUKLIAN, H. e ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the Azospirillum brasiliense Sp 7 glutamine synthetase structural gene. Bichimie, 68:1181-7, 1986.
- 20 BOZOUKLIAN, H., FOGHER, C. e ELMERICH, C. Cloning and characterization of the glnA gene of Azospirillum brasiliense Sp7. Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 137B:3-18, 1986.

- 21 BRAY, G.A. A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal. Biochem., 1:279-85, 1960.
- 22 BRIGLE, K.E., WEISS, M.C., NEWTON, W.E. e DEAN, D.R. Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthesis genes, nifE and nifN, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, nifD and nifK. J. Bacteriol., 169:1547-53, 1987.
- 23 BRUIJN, F.J. e LUPSKI, J.R. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetics maps of DNA fragments cloned in multi-copy plasmids: a review. Gene, 27:131-49, 1984.
- 24 BRUIJN, F.J., PAWLOWSKI, K., RATET, P., HILGERT, U., WONG, C.H., SCHNEIDER, M., MEYER, H.A. e SCHELL, J. Molecular genetics of nitrogen fixation by Azorhizobium caulinodans ORS571, the diazotrophic stem nodulating symbiont of Sesbania rostrata. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen Fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fisher, 1988. p.351-5.
- 25 BUCHANAN-WOLLASTON, V. e CANNON, F. Regulation of nif transcription in Klebsiella pneumoniae. In: VEEGER, C. e NEWTON, W.E., ed. Advances in nitrogen fixation research. Hague, Martinus Nijhoff, 1983. p.732.
- 26 BUCHANAN-WOLLASTON, V., CANNON, M.C., BEYNON, J.C. e CANNON, F. The role of the nifA gene product in the regulation of nif expression in Klebsiella pneumoniae. Nature, 294:776-8, 1981.

- 27 BUCK, M. Deletion analysis of the Klebsiella pneumoniae nitrogenase promoter: importance of spacing between conserved sequences around positions -12 and -24 for activation by nifA and ntrC (glnG) products. J. Bacteriol., 166:545-51, 1986.
- 28 BUCK, M. e CANNON, W. Mutation in the RNA polymerase recognition sequence of the Klebsiella pneumoniae nifH promoter permitting transcriptional activation in the absence of NifA binding to upstream activator sequences. Nucl. Acids Res., 17:2597-2612, 1989.
- 29 BUCK, M., CANNON, W. e WOODCOCK, J. Transcriptional activation of the Klebsiella pneumoniae nitrogenase promoters may involve DNA loop formation. Mol. Microbiol., 1:243-9, 1987.
- 30 BUCK, M., CANNON, W. e WOODCOCK, J. Mutational analysis of upstream sequences required for transcriptional activation of the Klebsiella pneumoniae nifH promoter. Nucl. Acids Res., 15:8945-56, 1987.
- 31 BUCK, M., KHAN, H. e DIXON, R.A. Site directed mutagenesis of the Klebsiella pneumoniae nifL and nifH promoters and "in vivo" analysis of promoter activity. Nucl. Acids Res., 13:7621-38, 1985.
- 32 BUCK, M., MILLER, S., DRUMMOND, M. e DIXON, R. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. Nature, 320:374-8, 1986.
- 33 BUCK, M., WOODCOCK, J., CANNON, W., MITCHENALL, L. e DRUMMOND, M. Positional requirements for the function of nif-specific upstream activator sequences. Mol. Gen. Genet., 210:140-1, 1987.

- 34 BUENO, R., PAHEL, G. e MAGASANIK, B. Role of ginB and ginD gene products in regulation of the ginALG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol., 164:816-22, 1985.
- 35 BUIKEMA, W.J., KLINGENSMITH, J.A., GIBBONS, S.L. e AUSUBEL, F.M. Conservation of structure and location of Rhizobium meliloti and Klebsiella pneumoniae nifB genes. J. Bacteriol., 169:1120-26, 1987.
- 36 BUIKEMA, W.J., SZETO, W.W., LEMLEY, P.V., ORME-JOHNSON, W.H. e AUSUBEL, F.M. Nitrogen fixation specific regulatory genes of Klebsiella pneumoniae and Rhizobium meliloti share homology with general nitrogen regulatory gene ntrC of Klebsiella pneumoniae. Nucl. Acids Res., 12:4539-55, 1985.
- 37 CANNON, F.C., DIXON, R.A. e POSTGATE, J.R. Derivation and properties of F-prime factors in Escherichia coli carrying nitrogen fixation genes from Klebsiella pneumoniae. J. Gen. Microbiol., 93:11-25, 1976.
- 38 CANNON, F., BEYNON, J., BUCHANAN-WOLLASTON, V., BURGHOFF, R., CANNON, M., KWIATKOWSKI, R., LAUER, G. e RUBIN, R. Progress in understanding organization and expression of nif genes in Klebsiella. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.453-60.
- 39 CANNON, M., HILL, S., KAVANAUGH, E. e CANNON, F. A molecular genetic study of nif expression in Klebsiella pneumoniae at the level of transcription, translation and nitrogenase activity. Mol. Gen. Genet., 198:198-206, 1985.

- 40 GEJUDO, F.J., TORRE, A. e PANEQUE, A. Short-term ammonium inhibition of nitrogen fixation in Azotobacter. Biochem. Biophys. Res. Commun., 123:431-7, 1984.
- 41 CHIEN-CHIN, Y. e NASH, H.A. Interaction of E. coli IHF protein with its specific binding sites. Cell, 57:869-80, 1989.
- 42 CLARKE, L. e CARBON, J. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell, 9:91, 1976.
- 43 CONTRERAS, A. e DRUMMOND, M. The effect on the function of transcriptional activator NtrC from Klebsiella pneumoniae of mutations in the DNA-recognition helix. Nucl. Acids Res., 16:4025-39, 1988.
- 44 CHISNELL, J.R., PREMAKUMAR, R., BISHOP, P.E. Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain of Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol., 170:27-33, 1988.
- 45 COLINS, J.J., ROBERTS, G.P. e BRILL, W.J. Posttranscriptional control of Klebsiella pneumoniae nif mRNA stability by the nifL product. J. Bacteriol., 168:173-8, 1986.
- 46 DALTON, H. e POSTGATE, J.R. Effect of oxygen on growth of Azotobacter chroococcum in batch and continuous culture. J. Gen. Microbiol., 54:463-73, 1969.
- 47 DAVID, M., DAVERAN, M.L., BATUT, J., DEDIEU, A., DOMERGUE, O., GHAI, J., HERTIG, C., BOISTARD, P., e KHAN, D. Cascade regulation of nif gene expression in Rhizobium meliloti. Cell, 54:671-83, 1988.

- 48 DEVEREUX, J., HAEBERLI, P. e SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analysis programs of the VAX. Nucl. Acids Res., 12:387-95, 1984.
- 49 DILWORTH, M.J., EADY, R.R. e ELDRIDGE, M.E. The vanadium nitrogenase of Azotobacter chroococcum: reduction of acetylene and ethylene to ethane. Biochem. J., 249:745-51, 1988.
- 50 DIXON, R.A. The complexity of nitrogen fixation. J. Gen. Microbiol., 130:2745-55, 1984.
- 51 DIXON, R. Tandem promoters determine regulation of the Klebsiella pneumoniae glutamine synthetase (glnA) gene. Nucl. Acids Res., 12:7811-30, 1984.
- 52 DIXON, R. Genetic Regulation of nitrogen fixation. In: COLE, J.A. e FERGUSON, S., ed. The nitrogen and sulphur cycles. Cambridge, Cambridge University, 1988. p.417-38.
- 53 DIXON, R., EADY, R.R. ESPIN, G. HILL, S. IACARINO, M., KAHN, D. e MERRICK, M. Analysis of regulation of Klebsiella pneumoniae nitrogen fixation (nif) genes cluster with gene fusions. Nature, 286:128-32, 1980.
- 54 DIXON, R.A., HENDERSON, N.C. e AUSTIN, S. DNA supercoiling and aerobic regulation of transcription from the Klebsiella pneumoniae nifLA promoter. Nucl. Acids Res., 16:9933-46, 1988.
- 55 DÖBEREINER, J. e PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Madison, Science Tech, 1987. 155p.

- 56 DORMAN, C.J., BARR, G.C., BHRIAIN, N.N. e HIGGINS, C.F. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of tonB gene expression. J. Bacteriol., 170:2816-2826, 1988.
- 57 DRETZEN, G., BELLARD, M., CORSI-SASSONE, P. e CHAMBON, P. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem., 112:295-8, 1981.
- 58 DROZD, J. e POSTGATE, J.R. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of Azotobacter chroococcum. J. Gen. Microbiol., 63:63-73, 1970.
- 59 DRUMMOND, M., CLEMENTS, J., MERRICK, M. e DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the nifLA promoter in Klebsiella pneumoniae. Nature, 301:302-7, 1983.
- 60 DRUMMOND, M., WHITTY, P. e WOOTTON, J. Sequence and domains relationship of ntrC and nifA from Klebsiella pneumoniae: homologies to other regulatory proteins. EMBO J., 5:441-7, 1986.
- 61 DRUMMOND, M.H. e WOOTTON, J.C. Sequence of nifL from Klebsiella pneumoniae: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. Mol. Microbiol., 1:37-44, 1987.
- 62 EADY, R.R. Regulation of nitrogenase activity. In: GIBSON, A. H. e NEWTON, W. E., ed. Current perspectives in nitrogen fixation. Canberra, Australian Acad. Sci., 1981. p.172-82.
- 63 EADY, R.R. Enzymology of free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J. e PÜHLER, A., ed. Nitrogen fixation. Oxford, Clarendon Press, 1986. v.4, p.1-49.

- 64 EADY, R.R. The vanadium-containing nitrogenase of *Azotobacters*. Biofactors, 1:111-6, 1988.
- 65 EADY, R.R., RICHARDSON, T.H., MILLER, R.W., HAWKINS, M. The vanadium nitrogenase of Azotobacter chroococcum: purification and properties, of the Fe protein. Biochem. J., 256:186-96, 1988.
- 66 EADY, R.R., ROBSON, R.L., PAU, R.N., WOODLEY, P., LOWE, D.J., MILLER, R.W., THORNELEY, R.N.F., SMITH, B.E. GORMAL, C., FISHER, K., ELDRIDGE, M. e BERGSTROM, J. The vanadium nitrogenase of Azotobacter chroococcum. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen Fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fisher, 1988. p.81-6.
- 67 EADY, R.R., ROBSON, R.L. e SMITH, B.E. Alternative and conventional nitrogenases. In: COLE, J.A. e FERGUSON, S., ed. The nitrogen and sulphur cycles. Cambridge, Cambridge University, 1988. p.363-82.
- 68 EARL, C.D., RONSON, C.W. e AUSUBEL, F.M. Genetic and structural analysis of the Rhizobium meliloti fixA, fixB, fixC and fixX genes. J. Bacteriol., 169:1127-36, 1987.
- 69 EBELING, S., HAHN, M., FISCHER, H.-M. e HENNECKE, H. Identification of nifE, nifN- and nifS-like genes in Bradyrhizobium japonicum. Mol. Gen. Genet., 207:503-8, 1987.
- 70 EBELING, S., ZÜRCHER, T., GUBLER, M., NOTI, J.D. e HENNECKE, H. Identification of two genes in Bradyrhizobium japonicum coding for a ferredoxin-like proteins. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fisher, 1988. p.366.

- 71 ELMERICH, C., GALLIMAND, M., VIEILLE, C., DELORME, F. e ZAMAROCZY, M. Nitrogen fixation in Azospirillum. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen Fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fisher, 1988. p.327-31.
- 72 ESPIN, G., ALVAREZ-MORALES, A. e MERRICK, M. Complementation analysis of glnA-linked mutations which affect nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae. Mol. Gen. Genet., 184:213-7, 1981.
- 73 ESPIN, G., ALVAREZ-MORALES, A., CANNON, F., DIXON, R. e MERRICK, M. Cloning of the glnA, ntrB and ntrC genes of Klebsiella pneumoniae and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (nif) gene cluster. Mol. Gen. Genet., 186:518-24, 1982.
- 74 EVANS, D., JONES, R., WOODLEY, P. e ROBSON, R. Further analysis of nitrogen fixation (nif) genes in Azotobacter chroococcum: identification and expression in Klebsiella pneumoniae of nifS, nifV, nifM and nifB genes and localization of nifE/N, nifU, nifA, and fixAG-like genes. J. Gen. Microbiol., 134:931-42, 1988.
- 75 FAHSOLD, R., SINGH, M. e KLINGMULLER, W. Cosmid cloning of nitrogenase structural genes of Azospirillum lipoferum. In: KLINCHMÜLLER, W., ed. Azospirillum III: genetics, physiology, ecology. Berlin, Springer Verlag, 1985. p.30-40
- 76 FALK, E.C., JOHNSON, J.L., BALDANI, V.L.D., DÖBEREINER, J. e KRIEG, N.R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera Azospirillum and Conglomeromonas. Int. J. Syst. Bacteriol., 36:80-5, 1986.

- 77 FALK, G., JOHANSSON, B.C. e NORDLUND, S. The role of glutamine synthetase in the regulation in the regulation of nitrogenase activity ("switch-off" effect) in Rhodospirillum rubrum. Arch. Microbiol., 132:251-3, 1982.
- 78 FANI, R., ALLOTTA, G., BAZZICALUPO, M., RICCI, F., SCHIPANI, C. e POLSINELLI, M. Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron-protein (nifH) of Azospirillum brasiliense and identification of a region controlling nifH transcription. Mol. Gen. Genet., 220:81-7, 1989.
- 79 FANI, R., BAZZICALUPO, M., DAMIANI, G., BIANCHI, A., SCHIPANI, C., SGARAMELLA, V. e POLSINELLI, M. Cloning of histidine genes of Azospirillum brasiliense: organization of the ABFH genes cluster and nucleotide sequence of the hisB gene. Mol. Gen. Genet., 216:224-9, 1989.
- 80 FANI, R., BAZZICALUPO, M., GALLORI, E., TURBANTI, L. e POLSINELLI, M. Construction of a gene bank of Azospirillum brasiliense. In: KLINGMÜLLER, W., ed. Azospirillum. Basel, Birkhäuser Verlag, 1983. p.1-9.
- 81 FEINBERG, A.P. e VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem., 137:266-267, 1984.
- 82 FIGURSKI, D.H. e HELINSKI, D.R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in "trans". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:1648-52, 1979.

- 83 FILLER, W.A., DIXON, R.A. e SMITH, B.E. FeMoco activity in Klebsiella pneumoniae requires the nifH gene. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.618.
- 84 FILLER, W.A., KEMP, R.M., NG, J.C., HAWKES, T.R., DIXON, R.A. e SMITH, B.E., The nifH gene product is required for synthesis or stability of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from Klebsiella pneumoniae. Eur. J. Biochem., 160:371-7, 1986.
- 85 FILSER, M., MERRICK, M. e CANNON, F. Cloning and characterization of nifLA regulatory mutations from Klebsiella pneumoniae. Mol. Gen. Genet., 191:485-91, 1983.
- 86 FISCHER, H.-M., BRUDERER, T. e HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the Bradyrhizobium japonicum NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. Nucl. Acids Res., 16:2207-24, 1988.
- 87 FISCHER, H.-M. e HENNECKE, H. Direct response of Bradyrhizobium japonicum nifA-mediated nif gene regulation to cellular oxygen status. Mol. Gen. Genet., 209:621-6, 1987.
- 88 FOGHER, C., BOZOUKLIAN, H., BANDHARI, S. K. e ELMERICH, C. Construction of a genomic library of Azospirillum brasiliense Sp7 and cloning of the glutamine synthetase gene. In: KLINGMÜLLER, W., ed. Azospirillum III: genetics, physiology, ecology. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.30-40.

- 89 FRIEDMAN, D.I. Integration host factor: a protein for all reasons. Cell, 55:545-54, 1988.
- 90 FRY, D.C., KUBY, S.A. e MILDVAN, A.S. ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F₁-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:907-11, 1986.
- 91 FU, A.-H. e BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in Herbaspirillum seropedicae. J. Bacteriol., 171:3168-75, 1989.
- 92 FU, A.-H., FITZMAURICE, W.P. LEHMAN, L.J., ROBERTS, G.P. e BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity in Azospirillum, herbaspirillum and acetobacter: and cloning of draG and draT-homologous genes of A. lipoferum SpBr17. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.336.
- 93 FU, H., HARTMANN, A., LOWERY, R.G., FITZMAURICE, W.P., ROBERTS, G.P. e BURRIS, R.H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in Azospirillum spp. J. Bacteriol., 171:4679-85, 1989.
- 94 FUNAYAMA, S., RIGO, L.U. e PEDROSA, F.O. NifA⁻ mutants of Azospirillum brasiliense strain Sp245. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.522.
- 95 GALLIMAND, M., PERROUD, B., DELORME, F., PAQUELIN, A., VIEILLE, C., BOZOUKLIAN, H. e ELMERICH, C. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes nifE, nifS and fixABC in Azospirillum brasiliense Sp 7. J. Gen. Microbiol., 135:1047-59.

- 96 GAUTHIER, D. e ELMERICH, C. Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in Spirillum lipoferum. FEMS Microbiol. Lett., 2:101-4, 1977.
- 97 GINSBURG, A. e STADTMAN, E.R. Regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli. In: PRUSINER, S. e STADTMAN, E.R, ed. The enzymes of glutamine metabolism. New York, Academic Press, 1974, p.9-44.
- 98 GOLDBERG, I., NADLER, V. e HOCHMAN, A. Mechanism of nitrogenase switch-off by oxygen. J. Bacteriol., 169:874-9, 1987.
- 99 GOLDENBERG, S., SALLES, J.M., FRANCO, M.P.A.L. e BONALDO, M.C. Construction of cDNA libraries. In: MOREL, C., ed. Genes and antigens of parasites. Rio de Janeiro, Fundação Osvaldo Cruz, 1984. p.187-209.
- 100 GOSINK, M.M., FRANKLIN, N.M. e ROBERTS, G.P. The product of the Klebsiella pneumoniae nifX gene is a negative regulator of the nitrogen fixation (nif) regulon. J. Bacteriol., 172:1441-7, 1990.
- 101 GOTTO, J.W. E YOCH D.C. Purification and Mn²⁺ activation of Rhodospirillum rubrum nitrogenase activating enzyme. J. Bacteriol., 152: 714-21, 1982.
- 102 GRÖNGER, P., MANIAN, S.S., REILANDER, H., O'CONNELL, M., PRIEFER, U.B. e PÜHLER, A. Organization and partial sequence of a DNA region of the Rhizobium leguminosarum symbiotic plasmid pRL6J1 containing the genes fixABC, nifA, nifB and a novel open reading frame. Nucl. Acids Res., 15:31-49, 1987.
- 103 GUBLER, M. e HENNECKE, H. fixA, B and C genes are essential for symbiotic and free living microaerobic nitrogen fixation. FEBS Lett., 200:186-92, 1987.

- 104 GUSSIN, G.N., RONSON, C.W. e AUSUBEL, F.M. Regulation of nitrogen fixation genes. Annu. Rev. Genet., 20:567-91, 1986.
- 105 GUTH, H.J. e BURRIS, R.H. The role of Mg^{2+} in the enzyme-catalyzed activation of nitrogenase Fe protein from Rhodospirillum rubrum. Biochem J., 213:741-9, 1983.
- 106 HAAKER, H. e KLUGKIST, J. The bioenergetics of electron transport to nitrogenase. FEMS Microbiology Reviews, 46:57-71, 1987.
- 107 HAAKER, H. e VEEGER, C. Involvement of the cytoplasmatic membrane in nitrogen fixation by Azotobacter vinelandii. Eur. J. Biochem., 77:1-10, 1977.
- 109 HAAS, D. e HOLLOWAY. Chromosome mobilization by the plasmid R68.45: a tool in Pseudomonas genetics. Mol. Gen. Genet., 158:229-37, 1978.
- 110 HARTMANN, A. e BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in Azospirillum brasiliense and Azospirillum lipferum. J. Bacteriol., 169:944-8, 1987.
- 111 HARTMANN, A., FU, H. e BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in Azospirillum spp. J. Bacteriol., 165:864-70, 1986.
- 112 HARDY, K. Bacterial plasmids. Nairobi, Thomas Nelson, 1981. 104p.

- 113 HASE, T., WAKABAYASHI, S., NAKANO, T., ZUMFT, W.G. e MATSUBARA, H. Structural homologies between the amino acid sequence of Clostridium pasteurianum MoFe protein and the DNA sequences of nifD and K genes of phylogenetically diverse bacteria. FEBS Lett., 166:39-43, 1984.
- 114 HAWKES, T., MERRICK, M. e DIXON, R. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from Klebsiella pneumoniae. Mol. Gen. Genet., 201:492-8, 1985.
- 115 HAWKES, T.R., MCLEAN, P.A. e SMITH, B.E. Nitrogenase from nifV mutant of Klebsiella pneumoniae contains an altered form of the iron molybdenum cofactor. Biochem. J., 217:317-21, 1984.
- 116 HIGGINS, D.G. e SHARP, P.M. Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene, 73:237-44, 1988.
- 117 HIGUTI, I.H. e PEDROSA, F.O. Mutant of Azospirillum brasiliense Sp7 that over-produces catalase. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.532.
- 118 HILL, S. Acetylene reduction by Klebsiella pneumoniae in air related to colony dimorphism on low fixed nitrogen. J. Gen. Microbiol., 91:207-9, 1975.
- 119 HILL, S. Influence of atmospheric oxygen concentration on acetylene reduction and efficiency of nitrogen fixation in intact Klebsiella pneumoniae. J. Gen. Microbiol., 93:335-45, 1976.

- 120 HILL, S. Redox regulation of enteric nif expression is independent of the fnr gene product. FEMS Microbiol. Lett. 29:5-9, 1985.
- 121 HILL, S. How is nitrogenase regulated by oxygen? FEMS Microbiol. Rev., 54:111-30, 1988.
- 122 HILL, S. e KAVANAGH, E. Role of nifF and nifJ gene products in electron transport to nitrogenase. J. Bacteriol., 141:470-5, 1980.
- 123 HILL, S., KENNEDY, C., KAVANAGH, E., GOLDBERG, R.B. e HANAU, R. Nitrogen fixation gene (nifL) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in K. pneumoniae. Nature, 290:424-6, 1981.
- 124 HIRSCHMAN, J., WONG, P.-K., SEI, K., KEENER, J. e KUSTU, S. Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrG of enteric bacteria activate glnA transcription "in vitro": evidence that the ntrA product is a σ factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:7525-29, 1985.
- 125 HOCHMAN, A., REICH, I. e NADLER, V. Effect of oxygen on nitrogenase of Rhodopseudomonas capsulata and Klebsiella pneumoniae. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.442.
- 126 HODGMAN, G. D., WEAST, R. C. e SELBY, M. S. Handbook of chemistry and physics. Cleveland, Chemical Rubber Publishing, 1960.
- 127 HOHN, B. In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. Methods Enzymol., 68:299-309, 1979.

- 128 HONTELEZ, J.G.J., LANKHORST, R.K., KATINAKIS, P., BOS, R.C. van der, KAMMEN, A. van. Characterization and nucleotide sequence of a novel gene fixW upstream of the fixABC operon in Rhizobium leguminosarum. Mol. Gen. Genet., 218:536-44, 1989.
- 129 HOOVER, T.R., IMPERIAL, J., LUDDEN, P. e SHAH, V. Homocitrate is incorporated into the iron-molybdenum cofactor and affects substrate specificity of nitrogenase. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.127.
- 130 HOOVER, T.R., ROBERTSON, A.D., CERNY, R.C., HAYES, R.N., IMPERIAL, J., SHAH, V.K. e LUDDEN, P.W. Identification of the V factor needed for synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase as homocitrate. Nature, 329:855-7, 1987.
- 131 HOOVER, T.R., SHAH, V.K., ROBERTS, G.P. e LUDDEN, P.W. nifV-dependent, low-molecular-weight factor required for in vitro synthesis of iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. J. Bacteriol. 167:999-1003, 1986.
- 132 HOWARD, K.S., MACLEAN, P.A., HANSEN, F.B., LEMLEY, P.V., KENNETH, S.K. e 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., 261:772-8, 1986.
- 133 HUALA, E. e AUSUBEL, F.M. The central domain of Rhizobium meliloti NifA is sufficient to activate transcription from the R. meliloti nifH promoter. J. Bacteriol., 171:3354-65, 1989.

- 134 HUNT, T.P. e MAGASANIK, B. Transcription of glnA by purified Escherichia coli components of glnF, glnG, and glnL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:8453-7, 1985.
- 135 IMPERIAL, J., SHAH, V.K., HOOVER, T.R. e LUDDEN, P.W. Characterization of components involved in the biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p. 128.
- 136 IMPERIAL, J., UGALDE, R.A., SHAH, V.K. e BRILL, W.J. Role of nifQ gene in the incorporation of molybdenum into nitrogenase Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol., 158:187-94, 1984.
- 137 IOANNADIS, I. e BUCK, M. Nucleotide sequence of the Klebsiella pneumoniae nifD gene and predicted aminoacid sequence of the α subunit of nitrogenase MoFe protein. Biochem. J., 247:287-91, 1987.
- 138 JACOBSON, M.R., CASH, V.L., WEISS, M.C., LAIRD, N.F., NEWTON, W.E. e DEAN, D.R. Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from Azotobacter vinelandii. Mol. Gen. Genet., 219:49-57, 1989.
- 139 JACOBSON, M.R., PREMAKUMAR, R. e BISHOP, P.E. Transcriptional regulation of nitrogen fixation by molybdenum nitrogenase in Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol., 167:480-6, 1986.
- 140 JARA, P., QUIVIGER, B., LAURENT, P. e ELMERICH, C. Isolation and genetic analysis of Azospirillum brasiliense Nif⁻ mutants. Can. J. Microbiol., 29:968-72, 1983.

- 141 JOERGER, R.D. e BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and genetic analysis of the nifB-nifQ region from Azobacter vinelandii. J. Bacteriol., 170:1475-87, 1988.
- 142 JOERGER, R.D., JACOBSON, M.R. e BISHOP, P.E. Two nifA-like genes required for expression of alternative nitrogenases by Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol., 171:3258-67, 1989.
- 143 JOERGER, R.D., JACOBSON, M.R., PREMAKUMAR, R., WOLFINGER, E.D. e BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (anfHDGK) for the second alternative nitrogenase from Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol., 171:1075-86, 1989.
- 144 JOHNSON, D.A., GAUTSCH, J.W., SPORTMAN, J.R. e ELDER, J.H. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. Gene Anal. Tech., 1:3-8, 1984.
- 145 JOUANNEAU, Y., MEYER, C. e VIGNAIS, P.M. Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion into an active and inactive form in Rhodopseudomonas capsulata. Biochim. Biophys. Acta, 749:318-28, 1983.
- 146 KANEMOTO, R.H. e LUDDEN, P.W. Effect of ammonia, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification in Rhodospirillum rubrum. J. Bacteriol., 158:713-20, 1984.

- 147 KEENER, J. e 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, **85**: 4976-80, 1988.
- 148 KENNEDY, C. The genetics of nitrogen fixation. In: HOPWOOD, D.A. e CHATER, K.F., ed. Genetics of bacterial diversity. London, Academic Press, 1989. p.107-27.
- 149 KENNEDY, C., GAMAL, R., HUMPHREY, R., RAMOS, J., BRIGLE, K. e DEAN, D. The nifH, nifM and nifN genes of Azotobacter vinelandii: characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. Mol. Gen. Genet. **205**:318-25, 1986.
- 150 KENNEDY, C. e TOUKDARIAN, A. Genetics of Azotobacters: Applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. Ann. Rev. Microbiol., **41**:227-58, 1987.
- 151 KENT, M.H., IOANNIDIS, I., GORMAL, C., SMITH, R.E. e BUCK, M. Site-directed mutagenesis of the Klebsiella pneumoniae nitrogenase. Biochem. J., **264**:257-64, 1989.
- 152 KHAN, H., BUCK, M. e DIXON, R. Deletion loop mutagenesis of the nifL promoter from Klebsiella pneumoniae: role of the -26 to -12 region in promoter function. Gene, **45**:281-8, 1986.
- 153 KHAN, D., DAVID, M., BATUT, J., DAVERAN, M.L. GARNERONE, A.M., HERTIG, C., PAQUES, F., LI RUO YA e BOISTARD, P. Cascade activation of nif genes in Rhizobium meliloti. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.357-61.

- 154 KIM, C.-H., DITTA, G. e HELINSKI, D.R. Transcriptional organization of a Rhizobium meliloti nif/fix gene clusters downstream from P2 overlapping transcription. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.186.
- 155 KLIPP, W., REILÄNDER, H., SCHLÜTER, A., KREY, R. e PÜHLER, A. A Rhizobium meliloti nitrogen fixation gene (fixY) encoding a ferredoxin-like protein forms a transcriptional unit with nifA and nifB. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.375.
- 156 KNAUF, V.C. e NESTER, E.W. Wide host range cloning vectors: a cosmid bank of an Agrobacterium Ti plasmid. Plasmid, 25:45-54, 1982.
- 157 KONG, Q.-T., WU, Q.-L., MA, Z.-F. e SHEN, S.-G. Oxygen sensitivity of the nifLA promoter of Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol., 166:353-6, 1986.
- 158 KONIGSBERG, W. e GODSON, G.N. Evidence for use of rare codons in the dnaG gene and other regulatory genes of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:687-691, 1983.
- 159 KUSTU, S., BURTON, D., GARCIA, E., MCCARTER, L. e MCFARLAND, N. Nitrogen control in Salmonella: regulation by the ginR and ginF gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4576-80, 1979.
- 160 KUSTU, S., SANTERO, E., KEENER, J., POPHAM, D. e WEIS D. Expression of σ^{54} (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. Microbiol. Rev., 53:367-76, 1989.

- 161 LAANE, C., KRONE, W., KONINGS, W., HAAKER, H. e VEEGER, C. Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by Azotobacter vinelandii and of bacteroids of Rhizobium leguminosarum. Eur. J. Biochem., 102:39-46, 1980.
- 162 LEONARDO, J.M. e GOLDBERG, R.B. Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol., 142:99-110, 1980.
- 163 LEWIN, B. Genes. New York, John Wiley, 1983. 715 p.
- 164 LONG, S.R. Rhizobium genetics. Annu. Rev. Genet., 23:483-506.
- 165 LOWE, D.J., POSTGATE, J.R. e THORNELEY, R.N.F. Biochemical constraints of biological nitrogen fixation. In: MALIK, K.A., NAQVI, S.H.M. e ALEEM, M.I.H., ed. Nitrogen and the environment. Faisalabad (Pakistan), Nuclear Institute for Agriculture and Biology, 1985. p.73-91.
- 166 LOWERY, R.G., SAARI, L.L. e LUDDEN, P.W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from Rhodospirillum rubrum by ADP-ribosylation in vitro. J. Bacteriol., 166:513-8, 1986.
- 167 LOWRY, O.M., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L. e RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Mol. Chem., 193:265-75, 1951.

- 168 LUDDEN, P.W., ROBERTS, G.P., LOWERY, R.G., FITZMAURICE, W.P., SAARI, L.L., LEHMAN, L., LIES, D., WOEHLE, D., WIRT, H., MURREL, S.A., POPE, R.R. e KANEMOTO, R.H. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.157-62.
- 169 MACNEIL, T., MACNEIL, D., ROBERTS, G. P., SUPIANO, M. A. e BRILL, W. J. Fine structure mapping and complementation analysis of nif (nitrogen fixation) genes in Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol., 136:253-66, 1978.
- 170 MAGASANIK, B. Regulation of bacterial nitrogen assimilation by glutamine synthetase. TIBS, 2:9-12, 1977.
- 171 MAGASANIK, B., PRIVA, N.H., BRENCHLEY, J.E., TYLER, B.M., DELEO, A.B., STREICHER, S.L. e BENDER, R.A. Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthesis. Curr. Top. Cell. Regul., 8:1:9-38, 1974.
- 172 MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. e SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.
- 173 MASEPOHL, B., KLIPP, W. e PUHLL. . Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated nifA/nifB gene region of Rhodobacter capsulatus. Mol. Gen. Genet., 212:27-37, 1988.
- 174 MAZUR, B.J., RICE, D. e HASELKORN, R. Identification of blue algae nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:186-90, 1980.

- 175 MEAD, D.A., SZCZESNA-SKORUPA, E. e KEMPER, B. Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. Protein Engineering, 1:67-74, 1986.
- 176 MERRICK, M. Nitrogen control of nif regulon in Klebsiella pneumoniae: involvement of the ntrA gene and analogies between ntrC and nifA. EMBO J., 2:39-44, 1983.
- 177 MERRICK, M. Nitrogen regulation of nitrogen fixation. In: ESQUIVEL, S.S., ed. Nitrogen source control of microbial processes. Boca Raton, CRC Press, 1988. p.169-93.
- 178 MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in Klebsiella and Azotobacter. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.293-302.
- 179 MERRICK, M. e GIBBINS, J.R. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene ntrA of Klebsiella pneumoniae and comparison with conserved features in bacterial sigma factors. Nucl. Acids Res., 13:7607-20, 1985.
- 180 MERRICK, M., GIBBINS, J. e TOUKDARIAN, A. The nucleotide sequence of the sigma factor gene ntrA (rpoN) of Azotobacter vinelandii: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. Mol. Gen. Genet., 210:323-30, 1987.
- 181 MERRICK, M., HILL, S., HENNECKE, H., HAHN, M., DIXON, R. A. e KENNEDY, C. Repressor properties of the nifL gene product in Klebsiella pneumoniae. Mol. Gen. Genet., 185:75-81, 1982

- 182 MERRICK, M.J. e STEWART, W.D.P. Studies on the regulation and function of the Klebsiella pneumoniae ntrA gene. Gene, 35:297-303, 1985.
- 183 MILLER, J.H. Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1974. 466p.
- 184 MINCHIN, S.D., AUSTIN, S. e DIXON, R.A. The role of activator binding sites in transcriptional control of the divergently transcribed nifF and nifLA promoters from Klebsiella pneumoniae. Mol. Microbiol., 2:433-42, 1988.
- 185 MINCHIN, S.D., AUSTIN, S. e DIXON, R.A. Transcriptional activation of the Klebsiella pneumoniae nifLA promoter by NtrC is face-of-the-helix dependent and the activator stabilizes the interaction of sigma 54-RNA polymerase with the promoter. EMBO J., 11:3491-9, 1992.
- 186 MORRETT, E. e BUCK, M. NifA-dependent "in vivo" protection demonstrates that the upstream activator sequence of nif promoters is a protein binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:9401-5, 1988.
- 187 MORRETT, E. 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 promoter complex. J. Mol. Biol., 210:65-77, 1989.

- 188 MORETT, E., CANNON, W. e BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences of nif promoters and can be separated from the positive control function of NifA. Nucl. Acids Res., 16:11469-87, 1988.
- 189 NAGATANI, H., SHIMIZU, M. e VALENTINE, R.C. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. Arch. Microbiol., 79:164-75, 1971.
- 190 NAIR, S.K., JARA, P., QUIVIGER, B. e ELMERICH, C. Recent developments in the genetics of nitrogen fixation in Azospirillum. In: KLINGMÜLLER, W., ed. Azospirillum II: Genetics, physiology, ecology. Basel, Birkhauser-Verlag, 1983. p.29-38.
- 191 NELSON, L.M. e KNOWLES, R. Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by Azospirillum brasiliense. Can. J. Microbiol., 24:1395-403, 1978.
- 192 NEES, D.W., STEIN, P.A. e LUDWIG, R.A. The Azorhizobium caulinodans nifA gene: identification of upstream-activating sequences including a new element, the "anaerobox". Nucl. Acids Res., 16:9839-53, 1988.
- 193 NEYRA, C.A. e BERKUM, P. Nitrate reduction and nitrogenase activity in Spirillum lipoferum. Can. J. Microbiol., 23:306-10, 1977.
- 194 NIEVA-GOMEZ, D., ROBERTS, G.P. KLEVICKIS, S. e BRILL, W.J. Electron transport to nitrogenase in Klebsiella pneumoniae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2555-8, 1980.

- 195 NINFA, A.J. e MAGASANIK, B. Covalente modification of the ginG product, NRI, by the ginL product, NRII, regulates the transcription of the ginALG operon in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:5909-13, 1986.
- 196 NOTI, J.D., FOLKERTS, TURKEN, A.N. e SZALAY, A.A. Organization and characterization of genes essential for symbiotic nitrogen fixation from Bradyrhizobium japonicum 1110. J. Bacteriol., 167:774-83, 1986.
- 197 OKON, Y., CAKMAKCI, L., NURS, I. e CHET, I. Aerotaxis and chemotaxis of Azospirillum brasiliense. Microbial Ecology, 6:277-83, 1980.
- 198 OKON, Y., NUR, I. e HENIS, Y. Effect of oxygen concentration on electron transport components and microaerobic properties of Azospirillum brasiliense. In: KLINGMOLLER, W., ed. Azospirillum II: genetics, physiology, ecology. Basel, Birkhauser-Verlag, 1983. p.115-126.
- 199 OW, D.W. e AUSUBEL, F.M. Regulation of nitrogen metabolism genes by nifA gen product in Klebsiella pneumoniae. Nature, 301:307-13, 1983.
- 200 OW, D.W., GU, Q., XIONG, Y., ZHU, J.-B. e SHEN, S.-C. Regulation of Klebsiella pneumoniae nitrogen fixation gene promoters by regulatory proteins ntrC, nifA and nifL. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.461-7.
- 201 PABO, C.O. e SAUER, R.T. Protein-DNA recognition. Annu. Rev. Biochem., 53:293-321, 1984.

- 202 PAGANI, S., ELDIDGE, M. e EADY, R.R. Nitrogenase of Klebsiella pneumoniae: Rhodanese-catalysed restoration of activity of the inactive 2Fe species of the Fe protein. Biochem. J., 244:485-8, 1987.
- 203 PAHEL, G., ROTHSTEIN, D. M. e MAGASANIK, B. Complex ginA-ginL-ginG operon of Escherichia coli. J. Bacteriol., 150:202-13, 1982.
- 204 PAHEL, G. e TYLER, B. A new ginA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli. J. Bacteriol., 133:139-48, 1979.
- 205 PASSAGLIA, L.P., NUNES, C.P., ZAHA, A. e SCHRANK, I.S. The structural nitrogen fixation genes from Azospirillum brasiliense: determination of the nucleotide sequence. Livro de resumos do VI PAABS Congress. 1990. p.225.
- 206 PAU, R.N., MITCHENALL, L.A., EADY, R.R. e ROBSON, R.L. Genetics of Mo-independent nitrogenases. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.322.
- 207 PAU, R.N., MITCHENALL, L.A. e ROBSON, R.L. Genetic evidence for an Azotobacter vinelandii nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. J. Bacteriol., 171:124-9, 1989.
- 208 PAUL, W. e MERRICK, M. The nucleotide sequence of the nifM gene of Klebsiella pneumoniae and identification of a new nif gene: nifZ. Eur. J. Biochem., 170:259-65, 1987.

- 209 PAUL, W. e MERRICK, M. Analysis of the nifW, Z, M genes of Klebsiella pneumoniae. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.315.
- 210 PAUL, W. e MERRICK, M. The roles of the nifW, nifZ and nifM genes of Klebsiella pneumoniae in nitrogenase biosynthesis. Eur. J. Biochem., 178:675-82, 1989.
- 211 PHARMACIA LTD. Production of single strand pTZ1BR and pTZ19R. England, s.ed. n.p.
- 212 PEDROSA, F.O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. Ciência Hoje, 6:12-3, 1987.
- 213 PEDROSA, F.O. Physiology, biochemistry, and genetics, of Azospirillum and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. CRG Critical Reviews in Plant Sciences, 6:345-84, 1988.
- 214 PEDROSA, F.O. e YATES, M.G. Nif mutants of Azospirillum brasiliense: evidence for a nifA-type regulation. In: KLINGMÜLLER, W., ed. Azospirillum III: genetics, physiology, ecology. Basel, Birkhauser-Verlag, 1983. p.66-77.
- 215 PEDROSA, F.O. e YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of Azospirillum brasiliense by nifA and ntr (gin) type gene products. FEMS Microbiol. Lett., 23:95-101, 1984.
- 216 PERROUD, B., BANDHARI, S.K. e ELMERICH, C. The nifHDK operon of Azospirillum brasiliense Sp7. In: KLINGMÜLLER, W., ed. Azospirillum III: genetics, physiology, ecology. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.10-9.

- 217 PLATT, T. Transcription termination and the regulation of gene expression. Annu. Rev. Biochem., **55**:339-72, 1986.
- 218 POPHAM, D.L., SZETO, D., KEENER, J. e KUSTU, S. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. Science, **243**:629-35, 1989.
- 219 POSTGATE, J.R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge, Cambridge University Press, 1982.
- 220 PREMAKUMAR, R., LEMOS, E.M., BISHOP, P.E. Evidence for two dinitrogenase reductases under regulatory control by molybdenum in Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta, **797**:64-70, 1984.
- 221 QUINTO, C., DE LA VEGA, H., FLORES, M., FERNANDEZ, L., BALLADO, T., SOBERÓN, G. e PALACIOS, R. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature, **299**:724-6, 1982.
- 222 QUIVIGER, B., FRANCHE, C., LUTFALLA, C., HASELKORN, R. e ELMERICH, C. Cloning of a nitrogen fixation (nif) gene cluster of Azospirillum brasilense. Biochimie, **64**:495-502, 1982.
- 223 RAMOS, J.L. e ROBSON, R.L. Lesions in citrate synthase that affect aerobic nitrogen fixation by Azotobacter chroococcum. J. Bacteriol., **162**:746-51, 1985.
- 224 RAMOS, J.L. e ROBSON, R.L. Isolation and properties of mutants of Azotobacter chroococcum defective in aerobic nitrogen fixation. J. Gen. Microbiol., **131**:1449-58, 1985.

- 225 RAMOS, J. e ROBSON, R.L. Cloning of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from Azotobacter chroococcum, an enzyme important in aerobic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet., 208:481-4, 1987.
- 226 REITZER, L.J. e MAGASANIK, B. Expression of glnA in Escherichia coli is regulated at tandem promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1979-83, 1985.
- 227 REITZER, L.J. e MAGASANIK, B. Transcription of glnA in E. coli is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. Cell, 45:785-92, 1986.
- 228 RIGBY, P.W. G., DIECKMAN, M., RHODES, C. e BERG, P. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol., 113:237-51, 1977.
- 229 ROBERTS, G.P., MACNEIL, T., MACNEIL, D. e BRILL, W.J. Regulation and characterization of protein products coded by the nif (nitrogen fixation) genes of Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol., 136:267-79, 1978
- 230 ROBINSON, A.C., BURGESS, B.K. e DEAN, D.R. Activity, reconstitution, and accumulation of nitrogenase components in Azotobacter vinelandii mutant strains containing deletions within the nitrogenase structural gene cluster. J. Bacteriol., 166:180-6, 1986.
- 231 ROBINSON, A.C., DEAN, D.R. e BURGESS, B.K. Iron-molybdenum cofactor biosynthesis in Azotobacter vinelandii requires the iron protein of nitrogenase. J. Biol. Chem., 262:14327-32, 1987.

- 232 ROBSON, R.L. Characterization of an oxygen-stable nitrogenase complex isolated from Azotobacter chroococcum. Biochem. J., 181:569-75, 1979.
- 233 ROBSON, R.L., CHESSHYRE, J.A., WHEELER, C., JONES, R., WOODLEY, P.E. e POSTGATE, J. Genome size and complexity in Azotobacter chroococcum. J. Gen. Microbiol., 130:1603-12, 1984.
- 234 ROBSON, R., KENNEDY, C. e POSTGATE, J. Progress in comparative genetics of nitrogen fixation. Can. J. Microbiol., 29:954-67, 1983.
- 235 ROBSON, R., WOODLEY, P. e JONES, R. Second gene (nifH^{*}) coding for nitrogenase iron protein in Azotobacter vinelandii is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein. EMBO J., 5:1159-63, 1986.
- 236 ROBSON, R.L., WOODLEY, P., PAU, R. e EADY, R.R. Cloning and analysis of the structural genes (ynfD, ynfG e ynfK) for the VFe-protein of the Vnitrogenase from Azotobacter chroococcum. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.323.
- 237 ROBSON, R.L., WOODLEY, P., PAU, R. e EADY, R.R. Structural genes for the vanadium nitrogenase from Azotobacter chroococcum. EMBO J., 8:1217-24, 1989.
- 238 RUVKUN, G.B. e AUSUBEL, F.M. Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:191-5, 1980.
- 239 SANTERO, E., HOOVER, T., KEENER, J. e KUSTU, S. "In vitro" activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7346-50, 1989.

- 240 SANTERO, E., TOUKDARIAN, A., HUMPHREY, R. e KENNEDY, C. Identification and characterization of two nitrogen fixation regulatory regions, nifA and nfrX, in Azotobacter vinelandii and Azotobacter chroococcum. Mol. Microbiol., 2:303-14, 1988.
- 241 SHAH, V.K. e BRILL, W.J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:3249-53, 1977.
- 242 SHAH, V.K., HOOVER, T.R., IMPERIAL, J., PAUSTRON, T.D., ROBERTS, G.P. e LUDDEN, P.W. Role of the nif products and homocitrate in the biosynthesis of iron-molybdenum cofactor. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.115-20.
- 243 SHAH, V. K., STACEY, G. e BRILL, W. J. Electron transport to nitrogenase: purification and characterization of pyruvate:flavodoxin oxidoreductase, the nifJ gene product. J. Biol. Chem., 258:12064-8, 1983.
- 244 SHAW, D.J., RICE, D.W., GUEST, J.R. Homology between Gap and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in Escherichia coli. J. Mol. Biol., 166:241-7, 1982.
- 245 SHINE, J. e DALGARNO, L. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature, 254:34-8, 1975.
- 246 SIMON, R., PRIEGER, U. e PÜHLER. A broad host range mobilization system for "in vivo" genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technology, 1:784-91, 1983.

- 247 SIMON, R., QUANDT, J. e KLIPP, W. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. Submitted.
- 248 SINGH, M., TRIPATHI, A.K. e KLINGMÜLLER, W. Identification of a regulatory nifA type gene and physical mapping of cloned new nif regions of Azospirillum brasiliense. Mol. Gen. Genet., 219:235-40, 1989.
- 249 SMITH, A., HILL, S. e ANTHONY, C. A haemoprotein is not involved in the control by oxygen of enteric nitrogenase synthesis. J. Gen. Microbiol. 134:1499-1507, 1988.
- 250 SMITH, B.E., BISHOP, P.E., DIXON, R.A., EADY, R.R., FILLER, W.A., LOWE, D.J., RICHARDS, A.J.M., THONSON, A.J., THORNELEY, R.N.F. e POSTGATE, J.R. The iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.597-603.
- 251 SMITH, B.E., BUCK, M., EADY, R.R., LOWE, D.J., THORNELEY, R.N.F., ASHBY, G., DEISTUNG, J., ELDRIDGE, M., FISHER, K., GORMAL, G., IOANNIDIS, I., KENT, H., ARBER, J., FLOOD, A., GARNER, C.D., HASNAIN, S. e MILLER, R. Recent studies on the structure and function of molybdenum nitrogenase. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.91-100.
- 252 SMITH, B.E., EADY, R.R., LOWE, D.J. e GORMAL, C. The vanadium-iron protein of vanadium nitrogenase from Azotobacter chroococcum contains an iron-vanadium cofactor. Biochem. J., 250:299-302, 1987.

- 253 SMITH, B.E., FILLER, W.A., DIXON, R.A., KEMP, R.M., NG, J.C. e HAWKES, T.R. The nifH gene product is essential for the production of the active FeMoco of Klebsiella pneumoniae nitrogenase. In: ULRICH, W.R., APARICIO, P.J., SYRRET, P.J. e CASTILHO, F., ed. Inorganic nitrogen metabolism. Berlin, Springer Verlag, 1987. p.198.
- 254 STADEN, R. Automation of computer hadling of gel reading data produced by the shotgun method of DNA sequencing. Nucl. Acids Res., 10:4731-51, 1982.
- 255 STADEN, R. Graphic methods to determine the function of nucleic acid sequences. Nucl. Acids Res., 12:521-37, 1984.
- 256 STREICHER, S.L., SHANMUGAM, K.T., AUSUBEL, F.M., MORANDI, C. e GOLDBERG, R.B. Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae: evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. J. Bacteriol., 120:815-21, 1974.
- 257 SZETO, W.W., NIXON, B.T., RONSON, C.W. e AUSUBEL, F.M. Identification and characterization of the Rhizobium meliloti ntrG gene: R. meliloti has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. J. Bacteriol., 169:1423-32, 1987.
- 258 THÖNY, B., FISCHER, H.-M., ANTHAMATTEN, D., BRUDERER, T. e HENNECKE, H. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (fixRnifA) of Bradyrhizobium japonicum is expressed aerobically and is subject to a novel, nifA-indenpendent type of activation. Nucl. Acids Res., 15:8479-99, 1987.

- 259 THÖNY, B., ANTHAMATTEN, D. e HENNECKE. Dual control of the Bradyrhizobium japonicum symbiotic nitrogen fixation regulatory operon fixR nifA: analysis of "cis"- and "trans"-acting elements. J. Bacteriol., 171:4162-69, 1989.
- 260 THORNELEY, R.N.F., BERGSTROM, J., EADY R.R. e LOWE D.J. Vanadium nitrogenase from Azotobacter chroococcum MgATP-dependent electron transfer with the protein complex. Biochem. J., 257:789-94, 1989.
- 261 TOUKDARIAN, A. e KENNEDY, C. Regulation of nitrogen metabolism in Azotobacter vinelandii: isolation of ntr and glnA genes and construction of ntr mutants. EMBO J., 5:399-407, 1986.
- 262 TUBB, R.S. e POSTGATE J.R. Control of nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae. J. Gen. Microbiol., 79:103-17, 1973.
- 263 WALMSLEY, J., BALI, A., WOODLEY, P. e KENNEDY, C. Involvement of the regulatory genes nifA, vnfa, nfrX, ntrD and the structural genes nifUSXM in expression and activity of the three nitrogenases in Azotobacter vinelandii. Livro de resumos do 8th International congress on nitrogen fixation. 1990. E91.
- 264 WOLK, C., FLORES, E., SCHMETTERER, G., HERRERO, A. e ELHAI, J. Development of genetics of heterocyst-forming cyanobacteria. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. e NEWTON, W.E., ed. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.491-6.
- 265 YAMAMOTO, N. e DROFFNER, M.L. Mechanisms determining aerobic or anaerobic growth in the facultative anaerobe Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:2077-81, 1985.

- 266 YATES, M.G. The role of oxygen and hydrogen in nitrogen fixation. In: COLE, J.A. e FERGUSON, S., ed. The nitrogen and sulphur cycles. Cambridge, Cambridge University, 1988. p.383-416.
- 267 ZAMAROCZY, M., DELORME, F. e ELMERICH, C. Regulation of transcription and promoter mapping of the structural genes for nitrogenase (nifHDK) of Azospirillum brasiliense Sp 7. Mol. Gen. Genet., 220:88-94, 1989.
- 268 ZUMFT, W.G. e CASTILLO, F. Regulatory properties of the nitrogenase from Rhodopseudomonas palustris. Arch. Microbiol., 117:53-60, 1978.

ADENDO 1 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS INDIVIDUAIS

	10	20	30	40	50
301.15L	GTCGACAGGCACAGCTTGATATCGGGCGCGGTCTGCGAAATCAGCTCGAA				
300.0C	GTCGACAGGCACAGCTTGATATCGGGCGCGGTCTGCGAAATCAGCTCGAA				
CONSENSO	GTCGACAGGCACAGCTTGATATCGGGCGCGGTCTGCGAAATCAGCTCGAA				
	60	70	80	90	100
301.15L	GGTCTTGAAGGTCTTGGCCGGATTGGC*AGCGGGTCGCCAGGGACC*HCAA				
300.0C	GGTCTTGAAGGTCTTGGCCGGATTGGCCAGCGGGTCGCCAGGGAD*GGCAA				
CONSENSO	GGTCTTGAAGGTCTTGGCCGGATTGGCCAGCGGGTCGCCAGGGACCAGGCAA				
	110	120	130	140	150
301.15L	TGCCCAGCACCGTCATCTGCGGAATGGTCGAGGCCACCGCAAAGACCTTC				
300.0C	TGCCCAGCACCGTCATCTGCGGAATGGTCGAGGCCACCGCAAAGACCTTC				
300.0L	TGCGGAATGGTCGAGGCCACCGCAAAGACCTTC				
301.14L	ACCGCAAAGACCTTC				
CONSENSO	TGCCCAGCACCGTCATCTGCGGAATGGTCGAGGCCACCGCAAAGACCTTC				
	160	170	180	190	200
301.15L	TTGGCCGCTTGTTCGGGCGTGAGCTTT				
300.0C	TT				
300.0L	TTGGCCGCTTGTTCGGGCGTGAGCTTT				
301.14L	CGCTTGTTCGGGCGTGAGCTTT				
300.2C	CGCTTGTTCGGGCGTGAGCTTT				
CONSENSO	TTGGCCGCTTGTTCGGGCGTGAGCTTT				
	210	220	230	240	250
300.0L	CTCGTTGGCGCAATCGTATTCGGGTTGCAGTAGTTGCACGGATGTTAC				
301.14L	CTCGTTGGCGCAATCGTATTCGGGTTGCAGTAGTTGCACGGATGTTAC				
300.2C	CTCGTTGGCGCAATCGTATTCGGGTTGCAGTAGTTGCACGGATGTTAC				
CONSENSO	CTCGTTGGCGCAATCGTATTCGGGTTGCAGTAGTTGCACGGATGTTAC				
	260	270	280	290	300
300.0L	AGGCCGGTGCACCGCCACGTGCATACGGCGATAGGGATGAGCCTCT				
301.14L	AGGCCGGTGCACCGCCACGTGCATACGGCGATAGGGATGAGCCTCT				
300.2C	AGGCCGGTGCACGTGCATACGGCGATAGGGATGAGCCTCT				
301.13L	GCCACGTGCATACGGCGATAGGGATGAGCCTCT				
300.1L	TGCATACCGCATAGGGATGAGCCTCT				
301.14C	GTGATGAGCCTCT				
CONSENSO	AGGCCGGTGCACCGCCACGTGCATACGGCGATAGGGATGAGCCTCT				
	310	320	330	340	350
300.0L	TCGCTGTAGCAGGGATGGTCTT				
301.14L	TCGCTGTAGCAGGGATGGTCTTGCACCTTCCC				
300.2C	TCGCTGTAGCAGGGATGGTCTTGCACCTTCCC				
301.13L	TCGCTGTAGCAGGGATGGTCTTGCACCTTCCC				
300.1L	TCGCTGTAGCAGGGATGGTCTTGCACCTTCCC				
301.14C	TCGCTGTAGCAGGGATGGTCTTGCACCTTCCC				
300.3C	GATGGTTCTTGCACCTTCCC				
CONSENSO	GATGGTTCTTGCACCTTCCC				

	360	370	380	390	400
301.14L	GTCGGCGGGACCATCGGATGAA				
301.13L	GTCGGCGGGACCACCGATGAACCGCAACTH*	CTTTGCCGCCCTCACTGC			
300.1L	GTCGGCGGGACCATCGGATGAACCGCAACTGGCTTGD*	GCCTTCACTGC			
301.14C	GTCGGCGGGACCATCGGATGAACCGCAACTGGCTTGCCTTCACTGC				
300.3C	GTCGGCGGGACCATCGGATGAACCGCAACTGGCTTGD*	GCCTTCACTGC			
CONSENSO	GTCGGCGGGACCATCGGATGAACCGCAACTGGCTTGCCTTCACTGC				
	410	420	430	440	450
301.13L	TGGTGCCACAGCCTTGTGTTCGGCTACCTTGTCCAGCAAGGTGCCTAGC				
300.1L	TGGTGCCACAGCCTTGTGTTCGGCTAD*	TTGTCCAGCAAGGTGCCTAGC			
301.14C	TGGTGCCACAGCCTTGTGTTCGGCTACCTTGTCCAGCAAGGTGCCTAGC				
300.3C	TGGTGCCACAGCCTTGTGTTCGGCTACCTTGTCCAGCAAGGTGCCTAGC				
301.13C		TCGGCTACCTTGTCCAGCAAGGTGCCTAGC			
300.3L		TTGTCCAGCAAGGTGCCTAGC			
CONSENSO	TGGTGCCACAGCCTTGTGTTCGGCTACCTTGTCCAGCAAGGTGCCTAGC				
	460	470	480	490	500
301.13L	GATTTGATGTCCCT				
300.1L	GATTTGATGTCCCTGGATAACCGACGTATTGTGTGGGCTGCATGGATAGTCC				
301.14C	GATTTGATGCCCTGGATAACC				
300.3C	GATTTGATGTCCCTGGATAACCGACGTATTGTGT				
301.13C	GATTTGATGTCCCTGGATAACCGACGTATTGTGTGGGCTGCATGGATAGTCC				
300.3L	GATTTGATGTCCCTGGATAACCGACGTATTGTGTGGGCTGCATGGATAGTCC				
300.4C	ATGTCCTGGATA*CGACGTATTGTGTGGGCTGCATGGATAGTCC				
301.12L		TTGGGCTGCATGGATAGTCC			
301.11L		GCATGGAT*GT*C			
CONSENSO	GATTTGATGTCCCTGGATAACCGACGTATTGTGTGGGCTGCATGGATAGTCC				
	510	520	530	540	550
300.1L	CTTTCAGGAAAGTGTGATG				
301.13C	CTTTCAGGAAAGTGTGATGCCCTGGGCTTCTCCTGAGGGACATAGCCAAAACC				
300.3L	CTTTCAGGAAAGTGTGATGCCCTGGGCTTCTCCTGAGGGACATAGCCAAAACC				
300.4C	CTTTCAGGAAAGTGTGATGCCCTGGGCTTCTCCTGAGGGACATAGCCAAAAC*				
301.12L	CTTTCAGGAAA*TGATGCCCTGGGCTTCTCCTGAGGGACATAGCCAAAACC				
301.11L	CTTTCAGGAAAGTGTGATGCCCTGGGCTTCTCCTGAGGGACATAGCCAAAACC				
300.5C		CCTTCTCCTGAGGGACATAGCCAAAACC			
CONSENSO	CTTTCAGGAAAGTGTGATGCCCTGGGCTTCTCCTGAGGGACATAGCCAAAACC				
	560	570	580	590	600
301.13C	GTGCCAGACAAAAT				
300.3L	GTGCCAGACAAAATAATCAATCAATTCAATGACATAGCGGAGAATTGCGT				
300.4C	GTGCCAGACAAAATAATCAATCAATTCAATGACATAGCGGAGAATTGCGT				
301.12L	*TGCCAGACAAAATAATCAATCAATTCAATGACATAGCGGAGAATTGCGT				
301.11L	*TGCCAGACAAAATAATCAATCAATTCAATGACATAGCGGAGAATTGCGT				
300.5C	GTGCCAGACAAAATAATCAATCAATTCAATGACATAGCGGAGAATTGCGT				
301.12C	AGACAAAATAATCAATCAATTCAATGACATAGCGGAGAATT*CGT				
300.4L		ATCAATTCAATGACATAGCGGAGAATTGCGT			
CONSENSO	GTGCCAGACAAAATAATCAATCAATTCAATGACATAGCGGAGAATTGCGT				

	610	620	630	640	650
300.3L	CGTACGGCGATGTGAGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGGTGGCG				
300.4C	CGTACGGCGATGTGAGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGGTGGCG				
301.12L	CGTACGGCGATGTGAGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGGTGGCG				
301.11L	GTACGGCGATGTGAGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGGTGGCG				
300.5C	CGTACGGCGATGTGAGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGGTGGCG				
301.12C	CGTACGGCGATGTGAGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGG*TGGCG				
300.4L	CGTACGGCGATGTGAGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGGTGGCG				
301.11C	AGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGGTGGCG				
300.5L	ATTGTGGTGGCG				
300.6C	GGGTGGCG				
CONSENSO	CGTACGGCGATGTGAGGATAGCGACAATCGCGATAACATTGTGGTGGCG				
	660	670	680	690	700
300.3L	CTTGTATGAACACGACAATGCAGCACGGGCCGGCG				
300.4C	CTTGTATGAACACGACATGCAGCA				
301.12L	CTTGTAT				
301.11L	TTGTATGAACACG				
300.5C	CTTGTATGAACACGACAATGCAGCA*GGGCGGGCGCCTGCAATT				
301.12C	CTTGTATGAACACGACAATGCAGCACGGCGCGCCTGCAATTGA*C*				
300.4L	CTTGTATGAACACGACAATGCAGCACGGCGCGCCTGCAATTGAGCG				
301.11C	CTTGTATGAACACGACAATGCAGCACGGCGCH*CGCCTGCAATTGAGCG				
300.5L	CTTGTATGAACACGACAATGCAGCACGGCGCGCCTGCAATTGAGCG				
300.6C	CTTGTATGAACACGACAATGCAGCACGGCGCGCCTGCAATTGAGCG				
301.10L	ACAATGCAGCACGGCC*GCCCTGCAATTGAGCG				
CONSENSO	CTTGTATGAACACGACAATGCAGCACGGCGCGCCTGCAATTGAGCG				
	710	720	730	740	750
300.4L	CGCCGCAATGAGGCTGACGCAGTGGAGAAGGAGAAGGAGAATGCGAGGAC				
301.11C	CGCCGCAATGAGCCTGACGCAGTGGAGAAGGAGAAGGAGAATGCGAGGAC				
300.5L	CGCCGCAATGAGCCTGACGCAGTGGAGAAGGAGAAGGCGAGGAC				
301.12C	*GCCGCAATGAGCCTGACGCAGTGGAGAAGGAGAAGGAGAATGCGAGGAC				
300.6C	CGCCGCAATGAGCCTGACGCAGTGGAGAAGGAGAAGGAGAATGCGAGGAC				
301.10L	CGCCGCAATGAGCCTGACGCAGTGGAGAAGGAGAAGGAGAATGCGAGGAC				
301.10C	AATGCGAGGAC				
301.9L	CAGGAC				
CONSENSO	CGCCGCAATGAGCCTGACGCAGTGGAGAAGGAGAAGGAGAATGCGAGGAC				
	760	770	780	790	800
300.4L	GTGCC*AGCCGGGAATCCATCAATAACAACCGGCTGGCGCGACG*CGAAG				
301.11C	GTGCC*AGCCGG				
300.5L	GTGCCAGCCGGGAATCCATCAATAACAACCGGCTGGCGCGACG*CGAAG				
301.12C	GTGCC*AGCCGGGG				
300.6C	GT				
301.10L	GTGCC*AGCCGGGAATCCATCAATAACAACCGGCTGGCGCGACGCCGAAG				
301.10C	GTGCC*AGCCGGG*AATCCATCAATAACAACCGGCTG*GCCGACGCCGAAG				
301.9L	ATGCC*AGCCGGG*AA*CCA*CAA*ACAACCGGCTGGCGCGACGCCGAAG				
300.6L	CCGGGGGAATCCATCAATAACAACCGGCTGGCGCGACGCCGAAG				
CONSENSO	GTGCCAGCCGGGAATCCATCAATAACAACCGGCTGGCGCGACGCCGAAG				

	810	820	830	840	850
300.4L	AGACCGCGCGCGCA				
300.5L	AGACCGCGCGCGCAGGGCGAGGACGGCAATGAGAAAAAGAC				
301.10L	AGACCGCGCGCGCAGGGCGAGGACGGCAATGAGAAAAAGACTTGGATCT				
301.10C	AGACCGCGCGCGCAGGGCGAGGACGGCAATGAGAAAAAGACTTGGATCT				
301.9L	AGACCGCGCGCGCAGGGCGAGGACGGCAATGAGAAAAAGACTTGGATCT				
300.6L	AGACCGCGCGCGCAGGGCGAGGACGGCAATGAGAAAAAGACTTGGATCT				
301.9C	ACCGCGCGCGCAGGGCGAGGACGGCAATGAGAAAAAGACTTGGATCT				
300.7C	CGCGCGCAGGGCGAGGACGGCAATGAGAAAAAGACTTGGATCT				
CONSENSO	AGACCGCGCGCGCAGGGCGAGGACGGCAATGAGAAAAAGACTTGGATCT				
	860	870	880	890	900
301.10L	GGCAGCGT				
301.10C	GGCAGCGTATTACGTACGCTCGCAGATGAGTTTCAA	ACTTCTTGACCT			
301.9L	GGCAGCGTATTACGTACGCTCGCAAGTGA	GAGTTTCAA	ACTTCTTGACCT		
300.6L	GGCAGCGTATTACGTACGCTCGCAGATGAGTTTCAA	ACTTCTTGACCT			
301.9C	GGCAGCGTATTACGTACGCTCGCAG*TGAGTTTCAA	ACTTCTTGACCT			
300.7C	GGCAGCGTATTACGTACGCTCGCAGATGAGTTTCAA	ACTTCTTGACCT			
300.8C					ACCT
CONSENSO	GGCAGCGTATTACGTACGCTCGCAGATGAGTTTCAA	ACTTCTTGACCT			
	910	920	930	940	950
301.10C	CGATATTGAATTCTGCAGCGCATAGCCC	ATCTGGCGCGGGCGAGATGTTG			
301.9L	CGATATTGAATTCTGCAGCGCATAGCCC				
300.6L	CGATATTGAATTCTGCAGCGCATAGCCC	ATCTGGCGCGGGCGAGATGTTG			
301.9C	CGATATTGAATTCTGCAGCGCATAGCCC	ATCTGGCGCGGGCGAGATGTTG			
300.7C	CGATATTGAATTCTGCAGCGCATAGCCC	ATCTGGCGCGGGCGAGATGTTG			
300.8C	CGATATTGAATTCTGCAGCGCATAGCCC	ATCTGGCGCGGGCGAGATGTTG			
300.7L		TGCAGCGCATAGCCC	ATCTGGCGCGGGCGAGATGTTG		
CONSENSO	CGATATTGAATTCTGCAGCGCATAGCCC	ATCTGGCGCGGGCGAGATGTTG			
	960	970	980	990	1000
301.10C	AGTGC	GGGGCTGC			
301.9C	AGTGC	GGGGCTGCCTTGGCTTGCA	CCCAGCCACATTGCTCC	CATGGCCCC	
300.7C	AGTGC	GGGGCTGCCTTGGCTTGCA	CCCAGCCACATTGCTCC	CATGGCCCC	
300.8C	AGTGC	GGGGCTGCCTTGGCTTGCA	CCCAGCCACATTGCTCC	CATGGCCCC	
300.7L	AGTGC	GGGGCTGCCTTGGCTTGCA	CCCAGCCACATTGCTCC	CATGGCCCC	
301.8L		GTGCG	GGGGCTGCCTTGGCTTGCA	CCCAGCCACATTGCTCC	CATGGCCCC
301.8C		GGCGGGCTGCCTT*	GCTTGCA	CCCAGCCACATTGCTCC	CATGGCCCC
300.8L				TGCTCC	CATGGCCCC
CONSENSO	AGTGC	GGGGCTGCCTTGGCTTGCA	CCCAGCCACATTGCTCC	CATGGCCCC	
	1010	1020	1030	1040	1050
301.9C	GAGCTCGA				
300.8C	G				
300.7L	GATAAGACGTTCGCGTTCGGAGGT	CGGGGGCGCGGGCG*	CAGTGGCTTGTG		
301.8L	GATAAGACGTTCGCGTTCGGAGGT	CH*GGGCGCGGGCGCC	CAGTGGCTTGTG		
301.8C	GATAAGACGTTCGCGTTCGGAGGT	CGGGGG*	CGCGGGCGCC	CAGTGGCTTGTG	
300.8L	GATAAGACGTTCGCGTTCGGAGGT	CGGGGGCGCGGGCG*	CAGTGGCTTGTG		
301.7L				CCAGTGGCTTGTG	
CONSENSO	GATAAGACGTTCGCGTTCGGAGGT	CGGGGGCGCGGGCGCC	CAGTGGCTTGTG		

	1060	1070	1080	1090	1100
300.7L	CTTGGCCATCCCACTCGGCGAAGATGGCG*CGTATG*C**GGATATGCG*				
301.8L	CTTGGCCATCCCACTCGGCGAAGATG				
301.8C	CTTGGCCATCCCACTCGGCGAAGATG*CGCCGTATGGCGGGATATGCGC				
300.8L	CTTGGCCATCCCACTCGGCGAAGATGGCG*CGTATG*C**GGATATGCG*				
301.7L	CTTGGCCATCCCACTCGGCGAAGATG*CGCCGTATGGCGGGATATGCGC				
CONSENSO	CTTGGCCATCCCACTCGGCGAAGATGGCGGGTATGGCGGGATATGCGC				
	1110	1120	1130	1140	1150
300.7L	TCCAGCGGCAD*AD*ACGAC*GGTTGCTGCTGGCCGGGTTCATGCAAGAC				
301.8C	TCCAGCGGCACCCACCGACCGGGTTGCTGCTGGCCGGGTTCCGAGC				
300.8L	TCCAGCGGCAD*AD*ACGAD*GGTTGCTGCTGGCCGGGTTCATGCAAGAC				
300.9C	TCCAGCGGCACCCACCGACGAD*GGTTGCTGCTGGCCGGGTTCATGCAAGAC				
301.7L	TCCAGCGGCACCCACCGACGACCGGGTTGCTGCTGGCCGGGTTCATGCAAGAC				
301.7C	TCCAGCGGCACCCACCGACGACCGGGTTGCTGCTGGCCGGGTTCATGCAAGAC				
CONSENSO	TCCAGCGGCACCCACCGACGACCGGGTTGCTGCTGGCCGGGTTCATGCAAGAC				
	1160	1170	1180	1190	1200
300.7L	CTTGGTCAGGC				
300.8L	CTTGGTCAGGCATTGTT				
301.7L	CTTGGTCAGGCATTGTTCTGCTGACAGGAGAAATGCACCTCG*TGATCA				
300.9C	CTTGGTCAGGCATTGTTCTGCTGACAGGAGAAATGCACCTCGGTGATCA				
301.7C	CTTGGTCAGGCATTGTTCTGCTGACAGGAGAAATGCACCTCGGTGATCA				
301.6L	GGTCAGGCATTGTTCTGCTGACAGGAGAAATGCACCTCGGTGATCA				
300.10C	GTTCTGCTGACAGGAGAAATGCACCTCGGTGATCA				
CONSENSO	CTTGGTCAGGCATTGTTCTGCTGACAGGAGAAATGCACCTCGGTGATCA				
	1210	1220	1230	1240	1250
301.7L	GATCGCC				
300.9C	GATCGCCGCGCATCATGGTGGCAGTACGCTCGACACAATTTCAGTTCC				
301.7C	GATCGCCGCGCATCATGGTGGCAGTACGCTCGACACAATTTCAGTTCC				
301.6L	GATCGCCGCGCATCATGGTGGCAGTACGCTCGACACAATTTCAGTTCC				
300.10C	GATCGCCGCGCATCATGGTGGCAGTACGCTCGACACAATTTCAGTTCC				
300.10L	CGCATCATGGTGGCAGTACGCTCGACACAATTTCAGTTCC				
301.5L	TTCC				
CONSENSO	GATCGCCGCGCATCATGGTGGCAGTACGCTCGACACAATTTCAGTTCC				
	1260	1270	1280	1290	1300
300.9C	CGTACATTGCCCGGCCAGTAGCAATTCATCATGACCTTCATGGCCTGCGG				
301.7C	CGTACATTGCCCGGCCAGT				
301.6L	CGTAGATTGCCCGGCCAGTAGCAATTCATCATGACCTTCATGGCCTGCGG				
300.10C	CGTACATTGCCCGGCCAGTAGCAATTCATCATGACCTTCATGGCCTGCGG				
300.10L	CGTACATTGCCCGGCCAGTAGCAATTCATCATGACCTTCATGGCCTGCGG				
301.5L	CGTACATGCCGGCCA*TAGCAATTCATCATGACCTTCATGGC*TGCG*				
300.11L	ATCATGACCTTCATGGCCTGCGG				
CONSENSO	CGTACATTGCCCGGCCAGTAGCAATTCATCATGACCTTCATGGCCTGCGG				
	1310	1320	1330	1340	1350
300.9C	TGACATGGCCAC				
301.6L	TGACATGGCCACCATGGCGCGCTGGTTCTCCACACGGAATTTCAGGA				
300.10C	TGACA				
300.10L	TGACATGGCCACCATGGCGCGCTGGTTCTCCACACGGAATTTCAGGA				
301.5L	TGACATGGCCACCATGGCGCGCTGGTTCTCCACACGGAATTTCAGGA				
300.11L	TGACATGGCCACCATGGCGCGCTGGTTCTCCACACGGAATTTCAGGA				
300.6C	GACATGGCCACCATGGCGCGCTGGTTCTCCACACGGAATTTCAGGA				
301.4L	ATGGCGCGCTGGTTCTCCACACGGAATTTCAGGA				
301.5C	CCAGGA				
CONSENSO	TGACATGGCCACCATGGCGCGCTGGTTCTCCACACGGAATTTCAGGA				

	1360	1370	1380	1390	1400
300.10L	AGTGTTCACCAGATAGGAATATCCTCGCGCCGTTCGCGCAGCGGA				
301.5L	A*TGTTCCACCAGATAGGAATATCCTCGC*D*GTTCGCGGAGCGGGAG*A				
300.11L	AGTGTTCACCAGATAGGAATATCCTCGCGCCGTTCGCGCAGCGGAGGA				
300.6C	AGTGTTCACCAGATAGGAATATCCTCG*GCCGTTGCCAGCGGAGGA				
301.4L	AGTGTTCACCAGATAGGAATATCCTCGC**CGTTGGCGAGCGGAGGA				
301.5C	AGTGTTCACCAGATAGGAATATCCTCGC**CGTTGCCAGCGGAGGA				
301.4C				GCAGCGGAGGA	
CONSENSO	AGTGTTCACCAGATAGGAATATCCTCGCGCCGTTCGCGCAGCGGAGGA				
	1410	1420	1430	1440	1450
301.5L	ATGAAGATGCTGACCACATTGATAACGGTAATACAGG				
300.11L	ATGAAGATGCTGACCACATTGATAACGGTAATACAGGTGGCCCGGAACTC				
301.6C	ATGAAGATGCT				
301.4L	ATGAAGATGCTGACCACATTGATAACGGTAATACAGGTGGCCCGGAACTC				
301.5C	ATGAAGATGCTGACCACATTGATAACGGTAATACAGGTGGCCCGGAAGTC				
301.4C	ATGAAGATGCTGACCACATTGATAACGGTAATACAGGTGGCCCGGAACTC				
300.12C			GGTAATACAGGTGGCCCGGAACTC		
301.3L			ACAGGTGGCCCGGAACTC		
CONSENSO	ATGAAGATGCTGACCACATTGATAACGGTAATACAGGTGGCCCGGAACTC				
	1460	1470	1480	1490	1500
300.11L	GCCCTTGGCCACGGD*TTCTCCAGGTGCGGGTTGGTGGCGGTGACCAGAC				
301.4L	GCCCTTH*CCACGGCCTTCTCCAGGTGCGGGTTGGTGGCGGTGACCAGAC				
301.5C	GCCCTTH*CCACGGCCTTCTCCAGGTGCGGGTTGGTGGCGGTGACCAGAC				
301.4C	GCCCTTH*CCACGGCCTTCTCCAGGTGCGGGTTGGTGGCGGTGACCAGAC				
300.12C	GCCCTTGGCCACGGD*TTCTCCAGGTGCGGGTTGGTGGCGGTGACCAGAC				
301.3L	GCCCTTH*CCACGGCCTTCTCCAGGTGCGGGTTGGTGGCGGTGACCAGAC				
CONSENSO	GCCCTTGGCCACGGCCTTCTCCAGGTGCGGGTTGGTGGCGGTGACCAGAC				
	1510	1520	1530	1540	1550
300.11L	GCACGTCCACCTTGATCGA				
301.4L	GCACGTCCACCTTGA				
301.5C	GC				
301.4C	GCACGTCCACCTTGATCGAACGGGACCCACCGACCCGCTCGAATTACGG				
300.12C	GCACGTCCACCTTGATCGAACGGGACCCACCGACCCGCTCGAATTACGG				
301.3L	GCACGTCCACCTTGATCGAACGGGACCCACCGACCCGCTCGAATTACGG				
300.12L			CCGCTCGAATTACGG		
CONSENSO	GCACGTCCACCTTGATCGAACGGGACCCACCGACCCGCTCGAATTACGG				
	1560	1570	1580	1590	1600
301.4C	TCCTGCAATACCGCAGCAG				
300.12C	TCCTGCAATACCGCAGCAGCTTGGCCTGGAAG*D*GGCGAGATCTCG				
301.3L	TCCTGCAATACCGCAGCAGCTTG*CCTGGAAGGGCGGGAGATCTCGCC				
300.12L	TCCTGCAATACCGCAGCAGCTTGGCCTGGAAG*C*GGCGAGATCTCGD*				
301.3C			CCGAGCAGCTTG*CCTGGAAGGGCGGGAGATCTCGCC		
301.2L				CCGCGAGATCTCGCC	
CONSENSO	TCCTGCAATACCGCAGCAGCTTGGCCTGGAAGGGCGGGAGATCTCGCC				
	1610	1620	1630	1640	1650
301.3L	GATCTCGTCGAGGAACAAGGTG*CGGCATGGCGAGTTCGAAACGGCCCT				
300.12L	GATCTCGTCGAGGAACAAGGTGCGGCATGGGC*AGTTCGAAACGGCCCT				
301.3C	GATCTCGTCGAGGAACAAGGTG*CGGCATGGCGAGTTCGAAACGGCCCT				
301.2L	GATCTCGTCGAGGAACAAGGTG**GCCATGGCGAGTTCGAAACGGCCCT				
300.13C			AAGGTGCCGCATGGGC*AGTTCGAAACGGCCCT		
301.2C				GGCGCCATGGCGAGTTCGAAACGGCCCT	
CONSENSO	GATCTCGTCGAGGAACAAGGTGCCGCATGGCGAGTTCGAAACGGCCCT				

	1660	1670	1680	1690	1700
301.3L	T				
300.12L	TGCGTTCACCCCTGGGCCCCGGTGAAGGCGCCCTTCGTGGCAAACAAAT				
301.3C	TGCGTTCACCCCTGGGCCCCGGTGAAGGCGCCCTTCGTGGCAAACAAAT				
301.2L	TGCGTTCACCCCTGGGCCCCGGTGAAGGCGCCCTTCGTGGCAAACAAAT				
300.13C	TGCGTTCACCCCTGGGCCCCGGTGAAGGCGCCCTTCGTGGCAAACAAAT				
301.2C	TGCGTTCACCCCTAGGCCCCGGTGAAGGCGCCCTTCGTGGCAAACAAAT				
301.1L	GGGGCCCCGTTGAAGGCGCCCTTCGTGGCAAACAAAT				
CONSENSO	TGCGTTCACCCCTGGGCCCCGGTGAAGGCGCCCTTCGTGGCAAACAAAT				
	1710	1720	1730	1740	1750
300.12L	TCGGATTCCAGCA				
301.3C	TCGGATTCCAGCAAGGTTCCGACAAGGCCGCACAGTTGACCTT				
301.2L	TCGGATTCCAGCAAGGTTCCGACAAGGCCGCACAGTTGA				
300.13C	TCGGATTCCAGCAAGGTTCCGACAAGGCCGCACAGTTGACCTTGATGAA				
301.2C	TCGGATTCCAGCAAGGTTCCGACAAGGCCGCACAGTTGACCTTGATGAA				
301.1L	TCGGATTCCAGCAAGGTTCCGACAAGGCCGCACAGTTGACCTTGATGAA				
300.13L			CAGTTGACCTTGATGAA		
300.14C			AGTTGACCTTGATGAA		
CONSENSO	TCGGATTCCAGCAAGGTTCCGACAAGGCCGCACAGTTGACCTTGATGAA				
	1760	1770	1780	1790	1800
300.13C	TGGCCCATCCTTGCAGGGACTGAGGTAATGGATGGCGCGCGATGACTT				
301.2C	TGGCCCATCCTTGCAGGGACTGAGGTAATGGATGCCGC				
301.1L	TGGCCCATCCTTGCAGGGACTGAGGTAATGGATGGCGCGCGATGACTT				
300.13L	TGGCCCATCCTTGCAGGGACTGAGGTAATGGATGGCGCGCGATGACTT				
300.14C	TGGCCCATCCTTGCAGGGACTGAGGTAATGGATGGCGCGCGATGACTT				
CONSENSO	TGGCCCATCCTTGCAGGGACTGAGGTAATGGATGGCGCGCGATGACTT				
	1810	1820	1830	1840	1850
300.13C	CCTTGGCGGTGCCGCTCTGGCGCAACAGCATGGTCGAGCGCGAGGGG				
301.1L	CCTTGGCGGTGCCGCTCTGGCGCAACAGCATGGTCGAGCGCGAGGGG				
300.13L	CCTTGGCGGTGCCGCTCTGGCGCAACAGCATGGTCGAGCGCGAGGGG				
300.14C	CCTTGGCGGTGCCGCTCTGGCGCAACAGCATGGTCGAGCGCGAGGGG				
301.1C	TTGGCGGTGCCGCTCTGGCGCAACAGCATGGTCGAGCGCGAGGGG				
301.0La			CAACAGCATGGTCGAGCGCGAGGGG		
300.14L			AGCATGGTCGAGCGCGAGGGG		
301.0Lb			AGGGG		
CONSENSO	CCTTGGCGGTGCCGCTCTGGCGCAACAGCATGGTCGAGCGCGAGGGG				
	1860	1870	1880	1890	1900
300.13C	GGGGACTGGTGT				
301.1L	GGGGACTGGTGTACCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC				
300.13L	GGGGACTGGTGTACCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC				
300.14C	GGGGACTGGTGTACCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC				
301.1C	GGGGACTGGTGTACCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC				
301.0La	GGGGACTGGTGTACCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC				
300.14L	GGGGACTGGTGTACCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC				
301.0Lb	GGGGACTGGTGTACCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC				
301.0C			CCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC		
301.0Ca			AAATGCC		
CONSENSO	GGGGACTGGTGTACCTGCAGGAACACTTCCTGATGCCCTGGAAATGCC				

	1910	1920	1930	1940	1950
300.13L	GATTACGTTATCGAGCTTGTACTTGCCTGGAGTTGCCGGACAGCTGGC				
300.14C	GATTACGT				
301.1C	GATTACGTTATCGAGCTTGTACTTGCCTGGAGTTGCCGGACAGCTGGC				
301.0La	GATTACGTTATCGAGCTTGTACTTGCCTGGAGTTGCCGGACAGCTGGC				
300.14L	GATTACGTTATCGAGCTTGTACTTGCCTGGAGTTGCCGGACAGCTGGC				
301.0Lb	GATTACGTTATCGAGCTTGTACTTGCCTGGAGTTGCCGGACAGCTGGC				
301.0Cb	GATTACGTTATCGAGCTTGTACTTGCCTGGAGTTGCCGGACAGCTGGC				
301.0Ca	GATTACGTTATCGAGCTTGTACTTGCCTGGAGTTGCCGGACAGCTGGC				
CONSENSO	GATTACGTTATCGAGCTTGTACTTGCCTGGAGTTGCCGGACAGCTGGC				
	1960	1970	1980	1990	2000
300.13L	G				
301.0La	GCTTTCTCTTGCAAGCTGCTGGCGCTCGG*CGCTACGCTGCGATACAGC				
300.14L	GCTTTCTCTTGCAAGCTGCTGGCGCTCGGCCGCTACGCTGCGATACAGC				
301.0Lb	GCTTTCTCTTGCAAGCTGCTGGCGCTCGGCCGCTACGCTGCGATACAGC				
301.0Cb	GCTTTCTCTTGCAAGCTGCTGGCGCTCGG*CGCTACGCTGCGATACAGC				
301.0Ca	GCTTTCTCTTGCAAGCTGCTGGCGCTCGG*CGCTACGCTGCGATACAGC				
CONSENSO	GCTTTCTCTTGCAAGCTGCTGGCGCTCGGCCGCTACGCTGCGATACAGC				
	2010	2020	2030	2040	2050
301.0La	CGGACGGTTTGTCCGAT				
300.14L	CGGACGGTTTGTCCGAT				
301.0Lb	CGGACGGTTTGTCCGATC				
301.0Cb	CGGACGGTTTGTCCGATCAGGTTGCCACCATGGTCAGCAGGCGCACCTC				
301.0Ca	CGGACGGTTTGTCCGATCAGGTTGCCACCATGGTCAGCAGGCGCACCTC				
305L	TGCCGTCAAGGTTGCCACCATGGTCAGCAGGCGCACCTC				
CONSENSO	CGGACGGTTTGTCCGATCAGGTTGCCACCATGGTCAGCAGGCGCACCTC				
	2060	2070	2080	2090	2100
301.0Cb	ATGGTCGA				
301.0Ca	ATGGTCGAC				
305L	ATGGTCGACACTACGCGAGGGCGATTGTCCATCCGAAAAACGCACAACA				
304L	GTCGACACTACGCGAGGGCGATTGTCCATCCGAAAAACGCACAACA				
CONSENSO	ATGGTCGACACTACGCGAGGGCGATTGTCCATCCGAAAAACGCACAACA				
	2110	2120	2130	2140	2150
305L	CACCCAGCATTTCACGGGCAGCCTTGATCGGCACGCCACAAAGGAAATG				
304L	CACCCAGCATTTCACGGGCAGCCTTGATCGGCACGCCACAAAGGAAATG				
304C	***CCACAAAGGAAATG				
CONSENSO	CACCCAGCATTTCACGGGCAGCCTTGATCGGCACGCCACAAAGGAAATG				
	2160	2170	2180	2190	2200
305L	ACTTCCCCGTCTTGCAGTGGCGCGGGCTGGTGUGAGCCAGGAACAGCGG				
304L	ACTTCCCCGTCTTGCAGTGGCGCGGGCTGGTGCGAGCCAGGAACAGCGG				
304C	ACTTCCCCGTCTTGCAGTGGCGCGGGCTGGTGCGAGCCAGGAACAGCGG				
305C	TCTTGCAGTGGCGCGGGCTGGTGCGAGCCAGGAACAGCGG				
CONSENSO	ACTTCCCCGTCTTGCAGTGGCGCGGGCTGGTGCGAGCCAGGAACAGCGG				
	2210	2220	2230	2240	2250
305L	CTCCTGGGCCAAGTCGCGCACCAACGATGGAGTTCCGTCTGGAAGATCT				
304L	CTCCTGGGCCAAGTCGCGCACCAACGATGGAGTTCCGTCTGGAAGAC				
304C	CTCCTGGGCCAAGTCGCGCACCAACGATGGAGTTCCGTCTGGAAGATCT				
305C	CTCCTGGGCCAAGTCGCGCACCAACGATGGAGTTCCGTCTGGAAGATCT				
CONSENSO	CTCCTGGGCCAAGTCGCGCACCAACGATGGAGTTCCGTCTGGAAGATCT				

	2260	2270	2280	2290	2300
305L	TGCC				
304C	TGCCGGT GATGCCCTCGCCGACCCGGTATCTGCCACTCTGGAATTCTTCG				
305C	TGCCGGT GATGCCCTCGCCGACCCGGTATCTGCCACTCTGGAATT				
303.12L				GAATTCTTCG	
CONSENSO	TGCCGGT GATGCCCTCGCCGACCCGGTATCTGCCACTCTGGAATTCTTCG				
	2310	2320	2330	2340	2350
304C	TAACTCAGGCCGATGGCGCTGACCAGTTGCAATTCAACGGAGTCCTGCAT				
303.12L	TAACTCAGGCCGATGGCGCTGACCAGTTGCAATTCAACGGAGTCCTGCAT				
303.12C	AACTCAGGCCGATGGCGCTGACCAGTTGCAATTCAACGGAGTCCTGCAT				
303.11L				GTCCTGCAT	
CONSENSO	TAACTCAGGCCGATGGCGCTGACCAGTTGCAATTCAACGGAGTCCTGCAT				
	2360	2370	2380	2390	2400
304C	CAGACTCAGCAATACCCGTTTCGTTT				
303.12L	CAGACTCAGCAATACCCGTTTCGTTTCCA				
303.12C	CAGACTCAGCAATACCCGTTTCGTTTCCAGGTGGCGGGAGAGGACGTTGA				
303.11L	CAGACTCAGCAATACCCGTTTCGTTTCCAGGTGGCGGGAGAGGACGTTGA				
302.0L	GCAATACCCGTTTCGTTTCCAGGTGGCGGGAGAGGACGTTGA				
303.11C	TTTCCAH* TGGCGG* AGAGGACGT* GA				
CONSENSO	CAGACTCAGCAATACCCGTTTCGTTTCCAGGTGGCGGGAGAGGACGTTGA				
	2410	2420	2430	2440	2450
303.12C	GGACTTCGCGCAAGGTCTTGGATAGATCCAGCGATGAACCCAATATCTTG				
303.11L	GGACTTCGCGCAAGGTCTTGGATAGATCCAGCGATGAACCCAATATCTTG				
302.0L	GGACTTCGCGCAAGGTCTTGGATAGATCCAGCGATGAACCCAATATCTTG				
303.11C	GGACTTCGCGCAAG* TCTTGGATAGATCCAGCGATGAACCCAATATCTTG				
302.1C				TTG	
CONSENSO	GGACTTCGCGCAAGGTCTTGGATAGATCCAGCGATGAACCCAATATCTTG				
	2460	2470	2480	2490	2500
303.12C	CTGATCTCGTAAATCGTTACGAGTT				
303.11L	CTGATCTCGTAAATCGTTACGAGTTCTAAATTCA				
302.0L	CTGATCTCGTAAATCGTTACGAGTTCTAAATTCAACTGCGGT CGTCGAG				
303.11C	CTGATCTCGTAAATCGTTACGAGTTCTAAATTCAACTGCGGT CGTCGAG				
302.1C	CTGATCTCGTAAATCGTTACGAGTTCTAAATTCAACTGCGGT CGTCGAG				
303.10L			TCTAAATTCAACTGCGGT CGTCGAG		
CONSENSO	CTGATCTCGTAAATCGTTACGAGTTCTAAATTCAACTGCGGT CGTCGAG				
	2510	2520	2530	2540	2550
302.0L	AATAGTGGCCATCTGACTCTCCTAACGTGAATACTGGAACCCCCATGCGCT				
303.11C	AATA* TGGCCATCTGACTCTCCTAACGTGAATACTGGAACCCCCATGCGCT				
302.1C	AATAGTGGCCATCTGACTCTCCTAACGTGAATACTGGAACCCCCATGCGCT				
303.10L	AATAGTGGCCATCTGACTCTCCTAACGTGAATACTGGAACCCCCATGCGCT				
303.10S	TATGGCCATCTGACTCTCCTAACGTGAATACTGGAACCCCCATGCGCT				
302.1L			CCCCATGCGCT		
CONSENSO	AATAGTGGCCATCTGACTCTCCTAACGTGAATACTGGAACCCCCATGCGCT				
	2560	2570	2580	2590	2600
303.11C	GC* TGAGAGCGCTAGAACCCGCCCTTGCTAC				
302.1C	GCCTGAGAGCGCTAGAACCCGCCCTTGCTACTCTGTCGTGAGATCCGAGAT				
303.10L	GCCTGAGAGCGCTAGAACCCGCCCTTGCTACTCTGTCGTGAGATCCGAGAT				
303.10S	GCCTGAGAGCGCTAGAACCCGCCCTTGCTACTCTGTCGTGAGATCCGAGAT				
302.1Lb			AACCCGCCCTTGCTACTCTGTCGTGAGATCCGAGAT		
302.2C			CCCCGCCCTTGCTACTCTGTCGTGAGATCCGAGAT		
302.1La			GCCTGAGAGCGCTAGAACCCGCCCTTGCTACTCTGTCGTGAGATCCGAGAT		
CONSENSO					

	2610	2620	2630	2640	2650
302.1C	CCTGAAAAACGGCAGAAAAAGGCCGTGTAATTACCGAATAGTTA				
303.10L	CCTGAAAA				
303.10S	CCTGAAAAACGGCAGAAAAAGGCCGTGTAATTACCGAATAGTTACCTTG				
302.1Lb	CCTGAAAAACGGCAGAAAAAGCGC*GTGTAATTACCGAATAGTTACCTTG				
302.2C	CCTGAAAAACGGCAGAAAAAGGCCGTGTAATTACCGAATAGTTACCTTG				
302.1La	CCTGAAAAACGGCAGAAAAAGGCCGTGTAATTACCGAATAGTTACCTTG				
302.2L	ATTACCGAATAGTTACCTTG				
303.9L	ATAGTTACCTTG				
CONSENSO	CCTGAAAAACGGCAGAAAAAGGCCGTGTAATTACCGAATAGTTACCTTG				
	2680	2670	2680	2690	2700
303.10S	CTGGTCAAGCAAACTTCATGCCCAAGCAGATGCATGAATCGATCTGGCCA				
302.1Lb	CTGGTCAAGCAAACTTCATGCCCAAGCAGATGCATGAATCGATCTGGCCA				
302.2C	CTGGTCAAGCAAACCTTC				
302.1La	CTGGTCAAGCAAACTTCATGCCCAAGCAGATGCATGAATCGATCT				
302.2L	CTGGTCAAGCAAACTTCATGCCCAAGCAGATGCATGAATCGATCTGGCCA				
303.9L	CTGGTCAAGCAAACTTCATGCCCAAGCAGATGCATGAATCGATCTGGCCA				
303.9C	ATGCCCAAGCAGATGCATGAATCGATCTGGCCA				
302.3C	CTCGCCA				
CONSENSO	CTGGTCAAGCAAACTTCATGCCCAAGCAGATGCATGAATCGATCTGGCCA				
	2710	2720	2730	2740	2750
303.10S	A				
302.1Lb	AGC				
302.2L	AGCAACCCCCACACAATGCCGGCTTCTCGATGTCGCCCTGGC*GGTTGG				
303.9L	AGCAACCCCCACACAATGCCGGCTTCTCGATGTCGCCCTGGCGGGTTGG				
303.9C	AGCAACCCCCACACAATGCCGGCTTCTCGATGTCGCCCTGGC*GGTTGG				
302.3C	AGCAACCCCCACACAATGCCGGCTTCTCGATGTCGCCCTGGC*GGTTGG				
CONSENSO	AGCAACCCCCACACAATGCCGGCTTCTCGATGTCGCCCTGGCGGGTTGG				
	2760	2770	2780	2790	2800
302.2L	CGACAACGGTGTGCTTTGTCGGATTTACGACAATCATGCCACTGGCG				
303.9L	CGACAACGGTGTGCTTTGTCGGATTTACGACAATCA				
303.9C	CGACAACGGTGTGCTTTGTCGGATTTACGACAATCATGCCACTGGCG				
302.3C	CGACAACGGTGTGCTTTGTCGGATTTACGACAATCATGCCACTGGCG				
302.3L	CGACAATCATGCCACTGGC*				
303.7L	CCACTGGCG				
CONSENSO	CGACAACGGTGTGCTTTGTCGGATTTACGACAATCATGCCACTGGCG				
	2810	2820	2830	2840	2850
302.2L	C				
303.9C	CAGCAATCAGAAATCGTCGCTATCCCATTGATTTAAAAGAAAAAATATTGT				
302.3C	CAGCAATCAGAAATCGTCGCTATCCCATTGATTTAAAAGAAAAA				
302.3L	CAGCAATCAGAAATCGTCGCTATCCCATTGATTTAAAAGAAAAAATATTGT				
303.7L	CAGCAATCAGAAATCGTCGCTATCCCATTGATTTAAAAGAAAAAATATTGT				
303.6L	ATCCCATTGATTTAAAAGAAAAAATATTGT				
303.8L	AATATTGT				
303.8C	ATATTGT				
CONSENSO	CAGCAATCAGAAATCGTCGCTATCCCATTGATTTAAAAGAAAAAATATTGT				

	2860	2870	2880	2890	2900
303.9C	ATGGCATGGTTTGGCTATTACCTGCATC*	GGCGCTCAC			
302.3L	ATGGCATGGTTTGGCTATTACCTGCATCGGCGCTACCGGCAAG				
303.7L	ATGGCATGGTTTGGCTATTACCTGCATCG*	GGCTACCGGCAAG			
303.6L	ATGGCATGGTTTGGCTATTACCTGCATCGGCGCTACCGGCAAG				
303.8L	ATGGCATGGTTTGGCTATTACCTGCATC*	GGCTACCGG			
303.8C	ATGGCATGGTTTGGCTATTACCTGCATCGGCGCTACCGGCAAG				
302.5C				CAAG	
CONSENSO	ATGGCATGGTTTGGCTATTACCTGCATCGGCGCTACCGGCAAG				
	2910	2920	2930	2940	2950
302.3L	CGAAACGACAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCCAGCCAGCGTTATGTAGCG				
303.7L	CGAAACGACAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCCAGCCAGCGTTATGTAGCG				
303.6L	CGAAACGACAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCCAGCCAGCGTTATGTAGCG				
303.8C	CGAAACGACAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCCAGCCAGCGTTATGTAGCG				
302.5C	CGAAACGA*AAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCCAGCCAGCGTTATGTAGCG				
302.4C				ATGTAGCG	
CONSENSO	CGAAACGACAAGCAGAGCAAGCCGGTAGCCCAGCCAGCGTTATGTAGCG				
	2960	2970	2980	2990	3000
302.3L	AGATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACATG				
303.7L	AGATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACATGAATGTGCCTTC				
303.6L	AGATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACATGAATGTGCCTTC				
303.8C	AGATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACATGAATGT				
302.5C	AGATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACATGAATGTGCCTTC				
302.4C	AGATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACATGAATGTGCCTTC				
302.5L			GCCCACATGAATGTGCCTTC		
303.7C			TGAAATGTGCCTTC		
CONSENSO	AGATATACAGACCTCCAACATCCACCATCGCCCACATGAATGTGCCTTC				
	3010	3020	3030	3040	3050
303.7L	GAATCCCGAAC				
303.6L	GAATCCCGAACCCGGTGCACCAACGTGCGTAGGGCGCCCTGCTCCCAGG				
302.5C	GAATCCCGAACCCGGTGGAC*CACGT*CGTGTGGCGCC*TGCTCC*AGG				
302.4C	GAATCCCGAACCCGGTGCACCAACGT*CGTGTGGCGCCCTGCTCCCAGG				
302.5L	GAATCCCGAACCCGGTGCACCAACGT*CGTGTGGCGCCCTGCTCCCAGG				
303.7C	GAATCCCGAACCCGGTGCACCAACGTGCGTAGGGCGCCCTGCTCCCAGG				
302.4L			CGTGTGGCGCCCTGCTCCCAGG		
303.6C			GCGCCCTGCTCCCAGG		
CONSENSO	GAATCCCGAACCCGGTGCACCAACGTGCGTAGGGCGCCCTGCTCCCAGG				
	3060	3070	3080	3090	3100
303.6L	CATGTTATCTGACCGTGAAC*	GGCGGT*GCCGGCCCGGCATGGC			
302.5C	CATGTTATCTGAC*	CTGAAC			
302.4C	CATGTTATCTGACCTGAAC*	GGCCGGTGCACCGGCC*GGCGATGGCGCG			
302.5L	CATGTTATCTGACCTGAAC*	GGCCGGTGCACCGGCC*GGCGATGGCGCG			
303.7C	CATGTTATCTGACCTGAAC*	GGCCGGTGCACCGGCC*GGCGATGGCGCG			
302.4L	CATGTTATCTGACCTGAAC*	GGCCGGTGCACCGGCC*GGCGATGGCGCG			
303.6C	CATGTTATCTGACCTGAAC*	GGCCGGT*G*CGGCCGGCATGGCGCG			
CONSENSO	CATGTTATCTGACCTGAAC*	GGCCGGTGCACCGGCCGGCATGGCGCG			
	3110	3120	3130	3140	3150
302.4C	GGCACCGCAA				
302.5L	GGCACCGAAACAGGTGATATGTGAGCCGCCACAATTAD*T*AACGGCGCA				
303.7C	GG				
302.4L	GGCACCGAAACAGGTGATATGTGAGCCGCCACAATTAD*T*AACGGCGCA				
303.6C	GGCACCGAAACAGGTGATATGTGAGCCGCCACAATTACCTAACGGCGCA				
CONSENSO	GGCACCGAAACAGGTGATATGTGAGCCGCCACAATTACCTAACGGCGCA				

	3160	3170	3180	3190	3200
302.5L	CCGGTTGCTGGCGCTGTGTGATGAATCCGGCTTGC	GC	AAACTGGT	GCTGC	
302.4L	CCGGTTGCTGGCGCTGTGTGATGAATCCGGCTTGC	GC	AAACTGGT	GCTGC	
303.6C	CCGGTTGCTGGCGCTGTGTGATGAATCC*GCTTGC	GC	AAACTGGT	GCTGC	
303.4L				TGCGC	AAACTGGT
CONSENSO	CCGGTTGCTGGCGCTGTGTGATGAATCCGGCTTGC	GC	AAACTGGT	GCTGC	
	3210	3220	3230	3240	3250
302.5L	ATCATATGCGGCC*TGC	GC*ATTCCCCGCTG	TTCGCACG	TTCG	CACAA
302.4L	ATCATATGCGGCC*TGC	GC*ATTCCCCGCTG	TTCGCACG	TTCG	B*T
303.4L	ATCATATGCGGCCCTGCGC	ATTCCCCGCTG	TTCGCACG	TTCG	CACAA
302.7C				ACAAT	
CONSENSO	ATCATATGCGGCCCTGCGC	ATTCCCCGCTG	TTCGCACG	TTCG	CACAA
	3260	3270	3280	3290	3300
302.4L	TGTTTGATTGCGTCAGCTCG	CGCATCGCCGACTTCG	TGGTGGAG	TGTCATG	
303.4L	TGTTTGATTGCGTCAGCTCG	CGCATCGCCGACTTCG	TGGTGGAG	TGTCATG	
302.7C	TGTTTGATTGCGTCAGCTCG	CGCATCGCCGACTTCG	TGGTGGAG	TGTCATG	
CONSENSO	TGTTTGATTGCGTCAGCTCG	CGCATCGCCGACTTCG	TGGTGGAG	TGTCATG	
	3310	3320	3330	3340	3350
302.4L	CGGGGGTCCGCTCTAC				
303.4L	CGGGGGTCCGCTCTACTACAGCC	AAACGCCATGCC	CATCTGCA	AGCGGGCG	
302.7C	CGGGGGTCCGCTCTACTACAGCC	AAACGC*ATGCC	CATCTGCA	AGCGGGCG	
303.2L		GCTCTACTACAGCC	AAACGCCATGCC	CATCTGCA	AGCGGGCG
302.7L		CTACTACAGCC	AAACGCCATGCC	CATCTGCA	AGCGGGCG
303.4C			TACAGCC	AAACGCCATGCC	CATCTGCA
CONSENSO	CGGGGGTCCGCTCTACTACAGCC	AAACGCCATGCC	CATCTGCA	AGCGGGCG	
	3360	3370	3380	3390	3400
303.4L	CAGGCTTGGCGTTGCTATTGGACGAAGCTGGG				
303.7C	CAGGCTTGGCGTTGCTATTGGACG				
303.2L	CAGGCTTGGCGTTGCTATTGGACGAAGCTGGGCG	CGAACTGTGG	CTGGTA		
302.7L	CAGGCTTGGCGTTGCTATTGGACGAAGCTGGGCG	CGAACTGTGG	CTGGTA		
303.4C	CAGGCTTGGCGTTGCTATTGGACGAAGCTGGGCG	CGAACTGTGG	CTGGTA		
CONSENSO	CAGGCTTGGCGTTGCTATTGGACGAAGCTGGGCG	CGAACTGTGG	CTGGTA		
	3410	3420	3430	3440	3450
303.2L	CAGCTTGGCATACCTTGACGATATCG	GTTTCCGGCCGC	**TGCGGG		
302.7L	CAGCTTGGCATACCTTGACGATATCG	GTTTCCGGCCGC	CTGCGGG		
303.4C	CAGCTTGGCATACCTTGACGATATCG	GTTTCCGD**GC	**TGCGGG		
CONSENSO	CAGCTTGGCATACCTTGACGATATCG	GTTTCCGGCCGC	CTGCGGG		
	3460	3470	3480	3490	3500
303.2L	GA	CTGGGCCTGGGGCGA	ACCCCTTGTG	CGATTCATCTG	CTGGTACGTCA
302.7L	GA	CTGGGCCTGGGGCGA	ACCCCTTGTG	CGATTCATCTG	CTGGTACGTCA
303.4C	GA	CTGGGCCTGGGGCGA	ACCCCT		
302.8C			***CCCTTGTG	CGATTCATCTG	CTGGTACGTCA
CONSENSO	GA	CTGGGCCTGGGGCGA	ACCCCTTGTG	CGATTCATCTG	CTGGTACGTCA
	3510	3520	3530	3540	3550
303.2L	TGCG*GCGTCGAACCGCC	GCGCGCTACCC	CCTATGAGCTGGTAC	GGCAGCT	
302.7L	TGCGCGCGTCGAACCGCC	GCGCGCTACCC	CCTATGAGCTGGTAC	GGCAGCT	
302.8C	TGCGCGCGTCGAACCGCC	GCGCGCTACCC	CCTATGAGCTGGTAC	GGCAGCT	
303.2C		TCGAACCGCC	GCGCTACCC	CCTATGAGCTGGTAC	GGCAGCT
303.1L				GTAC	GGCAGCT
CONSENSO	TGCGCGCGTCGAACCGCC	GCGCGCTACCC	CCTATGAGCTGGTAC	GGCAGCT	

	3560	3570	3580	3590	3600
303.2L	GGTTCCACTCGCCCCGCCA				
302.8C	GGTTCCACTCGCCCCGCCACCGACATGCTGCCGCCGATAGCH*	ATCTGATC			
303.2C	GGTTCCACTCGCCCCGCCACCGACATGCTGC*	GGCGATAGCGGATCTGATC			
303.1L	GGTTCCACTCGCCCCGCCACCGACATGCTGC*	G*CGATAGCGGATCTGATC			
302.9C	CCACTCGCCCCGCCACCGACATGCTGCCGCCGATAGCH*	ATCTGTAC			
302.9L			CTGATC		
CONSENSO	GGTTCCACTCGCCCCGCCACCGACATGCTGCCGCCGATAGCGGATCTGATC				
	3610	3620	3630	3640	3650
302.8C	CGGGCATCGGGAAAGATCCGAATCATGACC				
303.2C	CGGGCATCGGGAAAGATCCGAATCATGACCTGCGC*	ATCCGGCATGGCATC			
303.1L	CGGGCATCGGGAAAGATCCGAATCATGACCTGCGCCATCCGGCATGGCATC				
302.9C	CGGGCATCGGGAAAGATCCGAATCATGACCTGCGCCATCCGGCATGGCATC				
302.9L	CGGGCATCGGGAAAGATCCGAATCATGACCTGCGCCATCCGGCATGGCATC				
CONSENSO	CGGGCATCGGGAAAGATCCGAATCATGACCTGCGCCATCCGGCATGGCATC				
	3660	3670	3680	3690	3700
303.2C	CCCGCATCTGTTTCTTGAT				
303.1L	CCCGCATCTGTTTCTTGATGCGGCCGGTCTGAGCGATGTCCA	ACTCTTT			
302.9C	CCCGCATCTGTTTCTTGATGCGGCCGGTCTGAGCGATGTCCA	ACTCTTT			
302.9L	CCCGCATCTGTTTCTTGATGCGGCCGGTCTGAGCGA*	G*CCA	ACTCTTT		
302.8L		CTGAGCGATGTCCA	ACTCTTT		
303.1C			GTCCA	ACTCTTT	
CONSENSO	CCCGCATCTGTTTCTTGATGCGGCCGGTCTGAGCGATGTCCA	ACTCTTT			
	3710	3720	3730	3740	3750
303.1L	TCCCGTGAACCTGCCATGCCGATTACCGCAACGCTACGGCGTCTTCCT				
302.9C	TCCCGTGAACCTGCCATGCCGATTACCGCAACGCTACGGCGTCTT				
302.9L	TCCCGTGAACCTGCCATGCCGATTACCGCAACGCTACGGCGTCTT				
302.8L	TCCCGTGAACCTGCCATGCCGATTACCGCAACGCTACGGCGTCTTCCT				
303.1C	TCCCGTGAACCTGCCATGCCGATTACCGCAACGCTACGGCGTCTTCCT				
302.10C		CCGGATTACCGCAACGCTACGGCGTCTTCCT			
303.0L			TACGGCGTCTTCCT		
CONSENSO	TCCCGTGAACCTGCCATGCCGATTACCGCAACGCTACGGCGTCTTCCT				
	3760	3770	3780	3790	3800
303.1L	CA				
302.8L	CAATGTCGAAAATCCCCATGGCAACGGACGGGATGCGCTGTTGCAGACGG				
303.1C	CAATGTCGAAAATCCCCATGGCAACGGACGGGATGCGCTGTTGCAGACGG				
302.10C	CAATGTCGAAAATCCCCATGGCAACGGACGGGATGCGCTGTTGCAGACGG				
303.0L	CAATGTCGAAAATCCCCATGGCAACGGACGGGATGCGCTGTTGCAGACGG				
CONSENSO	CAATGTCGAAAATCCCCATGGCAACGGACGGGATGCGCTGTTGCAGACGG				
	3810	3820	3830	3840	3850
302.8L	TCGATCATGCCGTGGCAGAGGCCCTGGCTATCACGATGTCTGGGTC				
303.1C	TCGATCATGCCGTGGCAGAGGCCCTGGCTATCACGATGTCTGGGTC				
302.10C	TCGATCATGCCGTGGCAGAGGCCCTGGCTATCACGATGTCTGGGTC				
303.0L	TCGATCATGCCGTCTGGCAGAGGCCCTGGCTATCACGATGTCTGGGTC				
302.10L	ATCATGCCGTGGCAGAGGCCCTGGCTATCACGATGTCTGGGTC				
CONSENSO	TCGATCATGCCGTGGCAGAGGCCCTGGCTATCACGATGTCTGGGTC				

	3860	3870	3880	3890	3900
302.8L	GCCGAGCACCATT				
302.10G	GCCGAGCACCATTACAGCAGCTTCGCCATCGGCA				
303.0L	GCCGAGCACCATTACAGCAGCTTCGCCATCGGCAGCGCCTTGATGGTGCT				
302.10L	GCCGAGCACCATTACAGCAGCTTCGCCATCGGCAGCGCCTTGATGGTGCT				
302.11G	TGATGGTGCT				
CONSENSO	GCCGAGCACCATTACAGCAGCTTCGCCATCGGCAGCGCCTTGATGGTGCT				
	3910	3920	3930	3940	3950
303.0L	GCTGGCCAGATCGCCGCACGCACTTCGCGCATCCGCCTCGGTACGGGCG				
302.10L	GCTGGCCAGATCGCCGCACGCACTTCGCGCATCCGCCTCGGTACGGGCG				
302.11G	GCTGGCCAGATCGCCGCACGCACTTCGCGCATCCGCCTCGGTACGGGCG				
303.0C	CACTTCGCGCATCCGCCTCGGTACGGGCG				
CONSENSO	GCTGGCCAGATCGCCGCACGCACTTCGCGCATCCGCCTCGGTACGGGCG				
	3960	3970	3980	3990	4000
303.0L	CTTCGTTCGTGGCGCTCAATTGGAATC				
302.10L	CTTCGTTGCTGGCGCTCAATGATCCCTTGC GGTTGCCGAGGGACG				
302.11G	CTTCGTTGCTGGCGCTCAATGATCCCTTGC GGTTGCCGAGGGACGTCGCC				
303.0C	CTTCGTTGCTGGCGCTCAATGATCCCTTGC GGTTGCCGAGGGACGTCGCC				
302.11L	CCCTTGC GGTTGCCGAGGGACGTCGCC				
CONSENSO	CTTCGTTGCTGGCGCTCAATGATCCCTTGC GGTTGCCGAGGGACGTCGCC				
	4010	4020	4030	4040	4050
302.11G	ACGCTGGACCTGCTCAGCAACGGCCGGATGGAATTG				
303.0C	ACGCTGGACCTGCTCAGCAACGGCCGGATGGAATTG				
302.11L	ACGCTGGACCTGCTCAGCAACGGCCGGATGGAATTG				
CONSENSO	ACGCTGGACCTGCTCAGCAACGGCCGGATGGAATTG				

Alinhamento das leituras de sequências individuais fornecido pelo programa DButil. Este alinhamento foi obtido após a edição e conferência das sequências. A identificação do clone inclui o plasmídeo de origem (pEMS300, pEMS301, pEMS302, pEMS303, pEMS304 e pEMS305) e o número da deleção. As letras L e C indicam corridas longas ou curtas e as letras a e b após a identificação indica que as sequências foram obtidas em corridas diferentes. As sequências dos plasmídeos pEMS300, pEMS302 e pEMS304, bem como de seus derivados, estão no sentido original de leitura do gel enquanto que as dos plasmídeos restantes e derivados estão invertidas e complementadas.

ADENDO 2 - SEQUÊNCIA DA REGIÃO "POLYLINKER" DOS PLASMÍDEOS
pTZ18 E pTZ19

pTZ18

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG CAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT TCA ACC TTG GCA CTG GCC

pTZ19

ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CGG AGC TCG AAT TCA CTG GCC