

ANDRÉ LUIS FACHINI DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES *fdxA*,
modB2, *modE1* E *modE2* DE *Herbaspirillum seropedicae***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof^ª Dra Liu Un Rigo
Co-orientador: Prof^ª Dra Leda Satie Chubatsu

**CURITIBA
2007**

ANDRÉ LUIS FACHINI DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES *fdxA*,
modB2, *modE1* E *modE2* DE *Herbaspirillum seropedicae***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof^ª Dra Liu Un Rigo
Co-orientador: Prof^ª Dra Leda Satie Chubatsu

**CURITIBA
2007**

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho,

Agradeço as professoras Dr.^a Liu Un Rigo e Dr.^a Leda Satie Chubatsu pela orientação e amizade;

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

Ao professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo apoio e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores Dr.^a Rose Adele Monteiro, Dr. Leonardo Magalhães Cruz, Dr.^a Maria Berenice Reynaud Steffens e Dr.^a Elaine Machado Benelli e aos demais que de alguma forma contribuíram para o trabalho;

À Roseli Prado, Dona Ju e Valter pelo suporte técnico;

Agradeço também à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica;

Agradeço a professora Dr.^a Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz por incentivar meu ingresso no mestrado e por seus conselhos;

Gostaria de destacar meu agradecimento às agências financiadoras deste trabalho, CNPq/MCT, Fundação Araucária, Fundo Paraná de Ciência e Tecnologia e Instituto do Milênio/CNPq/PADCT;

A todos os amigos conquistados neste período e aos colegas de laboratório;

Meus sinceros agradecimentos aos meus familiares, em especial minha mãe Lila e meu irmão Charles pelo incentivo;

À Deus.....

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	1
1.2 ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nifE</i> E <i>mod</i> EM DIAZOTROFOS.....	3
1.3 METABOLISMO DE MOLIBDATO.....	6
1.3.1 Transporte de Molibdato em Bactéria.....	8
1.3.1.1 Sistema de transporte de molibdênio e regulação em <i>E. coli</i>	9
1.3.1.2 Proteína ModE.....	15
1.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLIBDOENZIMAS EM <i>E. coli</i>	20
1.5 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	26
3.2 MEIOS DE CULTURA.....	28
3.3 ANTIBIÓTICOS.....	29
3.4 ESTOCAGEM.....	29
3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA.....	30
3.5.1 Mini-preparação de Plasmídeos.....	30
3.5.2 Extração de DNA Cromossomal.....	31
3.5.3 Purificação de DNA em gel de Agarose de Baixo Ponto de Fusão.....	31
3.6 ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR.....	32
3.7 ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM.....	33
3.7.1 Digestão com Endonucleases de Restrição.....	33
3.7.2 Ligação de DNA.....	33
3.8 TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO.....	34
3.8.1 Preparo de Células Eletrocompetentes.....	34
3.8.2 Eletroporação.....	35
3.9 SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	36
3.9.1 Reação de Sequenciamento.....	36
3.9.2 Edição e Análise das Sequências.....	36
3.10 MUTAGÊNESE.....	37
3.10.1 Mutagênese Sítio Dirigida.....	37
3.10.2 Mutagênese de <i>H. seropedicae</i>	41
3.10.3 Hibridização de DNA (Southern Blot).....	41
3.10.3.1 Digestão do DNA cromossomal e separação em gel de agarose.....	41
3.10.3.2 Transformação e fixação do DNA à membrana de nylon.....	42
3.10.3.3 Preparo da sonda de DNA marcada com [³² P]dCTP.....	42
3.10.3.4 Pré-hibridização e hibridização.....	43
3.11 EXPERIMENTOS DE FISIOLOGIA.....	44

3.11.1 Ensaio de Atividade da Nitrogenase em Meio Semi-sólido.....	44
3.11.2 Ensaio de Desrepressão e Inativação Reversível da Nitrogenase por Amônio (Switch off/on).....	45
3.11.3 Ensaio de Atividade de β -galactosidase.....	45
3.12 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DE <i>modE1</i> E <i>modE2</i>	46
3.13 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ModE1 E ModE2 EM PEQUENA ESCALA.....	49
3.14 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ModE1 e ModE2.....	50
3.14.1 Eletroforese de Proteína em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).....	50
3.14.2 Purificação da Proteína His-ModE1.....	52
3.14.3 Rompimento das Células e preparação dos Corpos de Inclusão.....	53
3.14.4 Solubilização, Redobrimento e Cromatografia de Afinidade de His-ModE1...	53
3.14.5 Purificação da Proteína His-ModE2.....	54
3.14.6 Dosagem de Proteína.....	55
3.15 ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 A DNA.....	55
3.15.1 Marcação Radioisotópica da Região Promotora do Gene <i>modA2</i>	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nif</i> DE <i>H. seropedicae</i>	57
4.2 ANÁLISE DO GENE <i>fdxA</i> DE <i>H. seropedicae</i>	59
4.2.1 Mutagênese do gene <i>fdxA</i>	63
4.2.2 Ensaio Fisiológicos.....	66
4.2.2.1 Análise transcricional do gene <i>fdxA</i> de <i>H. seropedicae</i>	66
4.2.2.2 Atividade da nitrogenase.....	68
4.3 ANÁLISE DOS GRUPOS DE GENES <i>mod</i> DE <i>H. seropedicae</i>	74
4.3.1 Análise Transcricional do Gene <i>modB2</i> de <i>H. seropedicae</i>	84
4.3.2 Atividade da Nitrogenase no Mutante <i>modB2</i>	86
4.4 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>modE1</i> E <i>modE2</i>	88
4.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE1.....	90
4.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE2.....	94
4.7 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>modA2</i>	97
4.7.1 Análise ds Região Promotora de <i>modA2</i>	97
4.8 ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 À DNA.....	100
5 CONCLUSÕES	107
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

LISTA DE TABELAS

TABELA BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	26
1 -	
TABELA COMPOSIÇÃO DOS MEOS DE CULTURA DE <i>E. coli</i>	28
2 -	
TABELA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NFbHP.....	28
3 -	
TABELA ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DE <i>E. coli</i> E <i>H. seropedicae</i>	29
4 -	
TABELA SISTEMA DE MARCAÇÃO RADIOATIVA DE DNA UTILIZADO COMO SONDA PARA HIBRIDIZAÇÃO DE DNA.....	43
5 -	
TABELA ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE EM <i>H. seropedicae</i> SMR1 CONTENDO DIFERENTES CONSTRUÇÕES.....	67
6 -	
TABELA COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DOS PRODUTOS DOS GENES <i>modA1B1C1</i> E <i>modA2B2C2</i> DE <i>H. seropedicae</i>	76
7 -	
TABELA RESUMO DA PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 e His-ModE2 DE <i>H. seropedicae</i>	96
8 -	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA DOS COFADORES CONTENDO DE MOLIBDÊNIO.	7
FIGURA 2 -	SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO INTERGÊNICA ENTRE <i>modABC</i> E <i>modEF</i> DE <i>E. coli</i>	10
FIGURA 3 -	ARRANJO DOS DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS DO TIPO ModE DESCRITAS.....	17
FIGURA 4 -	ESTRUTURA DA PROTEÍNA ModE DE <i>E. coli</i>	19
FIGURA 5 -	SEQUÊNCIA DE ALGUNS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE ModE.....	22
FIGURA 6 -	ESQUEMA DE MUTAGÊNESE DOS GENES <i>fdxA</i> E <i>modB2</i> DE <i>H. seropedicae</i>	39
FIGURA 7 -	ESQUEMA DE CLONAGEM DOS GENES <i>modE1</i> E <i>modE2</i>	48
FIGURA 8 -	ESQUEMA DEPURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE1 DE <i>H. seropedicae</i>	52
FIGURA 9 -	ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES <i>mod</i> E <i>fdxA</i> EM <i>H. seropedicae</i>	58
FIGURA 10 -	ALINHAMENTO DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA FdxA DE <i>H. seropedicae</i> COM SEQUENCIAS DE OUTRAS PROTEÍNAS SIMILARES.....	61
FIGURA 11 -	ALINHAMENTO DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS Fdx1 e Fdx2 DE <i>H. seropedicae</i>	62
FIGURA 12 -	HIBRIDIZAÇÃO DE DNA DO GENOMA DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> SELVAGEM (SMR1) E MUTANTE <i>fdxA</i> (KC6 E KO3) COM A SONDA HS05-MF-037-A04.....	64
FIGURA 13 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO GENÔMICA DAS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTE KC6 APÓS INTEGRAÇÃO DO CASSETE <i>lacZ-Km</i>	65
FIGURA 14 -	ATIVIDADE DA NITROGENASE DAS ESTIRPES SELVAGEM SMR1 E MUTANTE KC6.....	69
FIGURA 15 -	EFEITO DA ADIÇÃO DE AMÔNIO NA ATIVIDADE DA NITROGENASE.....	71
FIGURA 16 -	ALINHAMENTO DAS SEQUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ModA1 E ModA2 DE <i>H. seropedicae</i> COM OUTRAS PROTEÍNAS ModA.....	77
FIGURA 17 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ModB1 e ModB2 DE <i>H. seropedicae</i>	79
FIGURA 18 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ModC1 E ModC2 DE <i>H. seropedicae</i>	81
FIGURA 19 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ModE1 e ModE2 DE <i>H. seropedicae</i>	83
FIGURA 20 -	ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE EM <i>H. seropedicae</i> ESTIRPES SELVAGEM (SMR1) E MUTANTE <i>modB2</i> (13-30).....	85
FIGURA 21 -	ATIVIDADE DA NITROGENASE DAS ESTIRPES SELVAGEM (SMR1) E MUTANTE NO GENE <i>modB2</i> (13-30) DE <i>H. seropedicae</i>	87
FIGURA 22 -	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>modE1</i> E <i>modE2</i> de <i>H. seropedicae</i>	89

FIGURA 23 -	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE1 SUPER-EXPRESSA EM <i>E. coli</i>	93
FIGURA 24 -	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE2 SUPER-EXPRESSA EM <i>E. coli</i>	95
FIGURA 25 -	SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO INTERGÊNICA ENTRE <i>modA2B2C2</i> E <i>modE2</i> DE <i>H. seropedicae</i>	99
FIGURA 26 -	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 NA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO À REGIÃO PROMOTORA DE <i>modA2</i> DE <i>H. seropedicae</i> NA AUSÊNCIA DE MOLIBDATO.....	102
FIGURA 27 -	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 NA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO À REGIÃO PROMOTORA DE <i>modA2</i> DE <i>H. seropedicae</i> NA AUSÊNCIA DE MOLIBDATO.....	103
FIGURA 28 -	ENSAIO DE COMPETIÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS DE DNA DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>modA2</i> MARCADO E NÃO MARCADO PELA LIGAÇÃO A His-ModE1.....	104
FIGURA 29 -	ENSAIO DE COMPETIÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS DE DNA DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>modA2</i> MARCADO E NÃO MARCADO PELA LIGAÇÃO A His-ModE2.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
Azul-de-bromofenol	3',3'',5',5''-tetrabromofenol-sulfonaftaleína
pb	pares de base
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DMSO	dimetil sulfóxido
D.O.	Densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamono tetracético
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilopares de bases nucleotídicas
kDa	quilodalton
ONP	orto-nitrofenil
ONPG	orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
<i>orf</i>	seqüência potencialmente codificadora de proteína (<i>open reading frame</i>)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluorídio
RNAse	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N',N',N',N', tetrametil-etilenodiamina
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	radiação ultravioleta

RESUMO

Na região a jusante dos genes estruturais da nitrogenase de *Herbaspirillum seropedicae* (*nifHDKENXorf1orf2*) estão localizados os genes *fdxA* (codifica uma ferredoxina do tipo 2[4Fe-4S]) e os genes *nifQmodA1B1C1*, relacionados com o transporte e incorporação de molibdênio em cofatores de molibdoenzimas. O gene *fdxA* foi mutagenizado pela inserção sítio-dirigida de um cassete *lacZ*-Km. Uma estirpe de *H. seropedicae fdxA⁻* foi construída e apresentou redução de 75% na atividade da nitrogenase comparada com a estirpe selvagem. O fenótipo apresentado, a localização do gene *fdxA* e sua cotranscrição com os genes *nifHDK* revelada por ensaios usando o gene repórter *lacZ*, sugerem o envolvimento de FdxA no transporte de elétrons para a nitrogenase ou biossíntese dos cofatores metálicos da nitrogenase. Entretanto, o produto do gene *fdxA* mostrou não estar envolvido no desligamento da nitrogenase em resposta à adição de íons amônio. Este resultado que contrasta com o obtido em *Azoarcus* onde a mutação do gene *fdxN*, que codifica uma ferredoxina 2[4Fe-4S], a jusante de *nifENX* levou a diminuição da inibição reversível da nitrogenase dependente de NH_4^+ . Além dos genes *modA1B1C1* localizados a jusante de *fdxA*, a análise da sequência genômica de *H. seropedicae* revelou um segundo grupo homólogo aos genes envolvidos com a captação de molibdato pela célula (*modA2B2C2*) e dois genes do tipo *modE* (*modE1* e *modE2*), possíveis reguladores transcricionais deste sistema. Mutantes no gene *modB2* apresentaram atividade da nitrogenase semelhante a da estirpe selvagem e análises de expressão *modB2::lacZ* indicaram que este gene é transcrito em condições de limitação de molibdato no meio de cultura. As proteínas ModE1 e ModE2 foram expressas e purificadas. A proteína recombinante (His)₆-ModE1 foi super-expressa como corpo de inclusão, solubilizada com uréia e renaturada em coluna durante a purificação por cromatografia de afinidade. A proteína (His)₆-ModE2 foi expressa na fração solúvel e também foi purificada por cromatografia de afinidade. Essas proteínas foram analisadas quanto a capacidade de ligar na região promotora de *modA2* através de ensaios de retardamento de banda em gel. As proteínas foram capazes de retardar a migração de DNA no ensaio, sugerindo a participação na regulação da expressão dos genes *modABC*.

ABSTRACT

In the region downstream from the *H. seropedicae* nitrogenase structural genes (*nifHDKENXorf1orf2*) are present the genes *fdxA* (codes for a 2[4Fe-4S] ferredoxin) and the *nifQmodAIBIC1* genes, related to the molybdate incorporation and transport. The *fdxA* gene was mutagenized by *lacZ*-Km insertion and the *H. seropedicae fdxA* mutant strain showed 75% reduction in nitrogen fixation activity compared to the wild type strain. The *fdxA* is also co-transcribed with *nifHDK*, as shown by *lacZ* reporter gene fusion, suggesting the involvement of FdxA in electron transport to nitrogenase or in the biosynthesis of the nitrogenase metal cofactors. Thereafter, the product of the *fdxA* gene is not involved in the nitrogenase switch off/on process in response to ammonium. The genomic sequencing has revealed a second similar set genes of molybdate uptake, *modA2B2C2* and two potential molybdate-dependent transcriptional regulators genes (*modE1* and *modE2*). A *modB2* mutant strain showed nitrogenase activity similar to the wild strain and the analysis of the expression of *modB2::lacZ* indicated that *modB2* is expressed under molybdate. The proteins (ModE1 and ModE2) were expressed and purified. The recombinant His-ModE1 protein was expressed as inclusion bodies, solubilized with urea, and on-column refolded during affinity chromatography. His-ModE2 was purified by affinity chromatography from the soluble fraction. Both proteins were assayed for DNA-binding activity. The results indicated that His-ModE1 and His-ModE2 bound to *modA2* promoter region, suggesting they may be involved in the regulation of the molybdate transport in *H. seropedicae*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio é a conversão de nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) realizada por alguns organismos procariotos que podem ser simbióticos, associativos ou de vida livre (POSTGATE, 1985; CAPONE, 2001).

O nitrogênio atmosférico não pode ser usado diretamente pelos sistemas biológicos para sintetizar componentes químicos essenciais como proteínas e ácidos nucléicos. Este composto é um dos principais nutrientes limitantes do crescimento de plantas. O uso de fertilizantes químicos é muito importante para a produção de alimentos, sendo indispensável para a agricultura moderna (BOHLOOL et al., 1992; CAPONE, 2001).

O nitrogênio fixado presente no ambiente é perdido por processos de desnitrificação microbiana, erosão, volatilização, além da remoção de resíduos de plantações contendo nitrogênio. A reserva de nitrogênio nos solos destinados à agricultura deve ser mantida em níveis adequados visando maximizar a produtividade agrícola. Portanto, o nitrogênio dos solos removido pelas culturas agrícolas é repostado pela adição de nitrogênio quimicamente fixado na forma de fertilizantes comerciais ou pela fixação biológica de nitrogênio (CAPONE, 2001).

A redução biológica do dinitrogênio atmosférico à amônia é catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase. Este complexo é formado pela Fe-proteína e pela MoFe-proteína (DEAN, BOLIN e ZHENG, 1993).

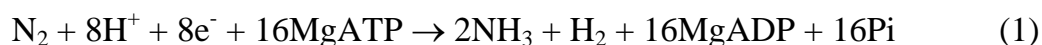
A Fe-proteína ou dinitrogenase redutase é uma proteína dimérica (γ_2), contendo um núcleo metálico 4Fe-4S capaz de transportar elétrons para a proteína MoFe (GIORGIADIS et al., 1992).

A MoFe-proteína ou dinitrogenase, maior componente do complexo, é um tetrâmero ($\alpha_2\beta_2$) que contém dois tipos de centros redox, o grupo P ([8Fe-7S]) e o cofator FeMo (7Fe-9S-Mo-Y-homocitrato), onde Y é provavelmente um átomo de N

(KIM e REES, 1992; EINSLE et al., 2002; HINNEMANN e NORSKOV, 2003). O grupo P media a transferência intramolecular de elétrons para o cofator FeMo (FeMoco), o qual é o sítio de ligação e redução do substrato (REES e HOWARD, 2000).

Todos os diazotrofos codificam uma nitrogenase contendo um cofator FeMo, porém em condições limitantes de molibdênio, alguns organismos sintetizam nitrogenases alternativas contendo cofatores V-Fe (*Azotobacter vinelandii*, *Rhodobacter capsulatus*) ou Fe-Fe (*Azotobacter vinelandii*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*) (PAU, MITCHENALL e ROBSON, 1989; SCHNEIDER et al., 1991; DAVIS et al., 1996; EADY, 1996).

A estequiometria da reação catalisada pela nitrogenase é descrita pela equação (1) (SIMPSON e BURRIS, 1984):



O fluxo de elétrons através da nitrogenase nesse processo envolve primeiramente a redução da Fe-proteína por proteínas doadoras de elétrons (ferredoxinas e/ou flavodoxinas), seguido pela transferência de elétrons da Fe-proteína para a MoFe-proteína, de uma maneira dependente da hidrólise de MgATP, e a transferência intramolecular de elétrons, do grupo P para o FeMoco, sítio de ligação e redução do substrato (HAAKER e KLUGKIST, 1987).

As vias pelas quais os elétrons são transportados para a nitrogenase são parcialmente conhecidas. Tem sido proposto que flavodoxinas ou ferredoxinas atuam como doadoras diretas de elétrons para a nitrogenase. Em *Azotobacter chroococcum*, foi demonstrado que uma flavodoxina transfere elétrons para a nitrogenase *in vitro* (YATES, 1972; DEISTUNG e THORNELEY, 1986). Em *Klebsiella pneumoniae*, esse processo envolve uma flavodoxina (*nifF*) e uma piruvato:flavodoxina oxidoreductase (*nifJ*). Extratos de células da estirpe selvagem de *K. pneumoniae* reduziram acetileno na presença de piruvato como redutor. Já

extratos de mutantes *nifF* foram inativos, porém a atividade foi estimulada com a adição da flavodoxina de *A. chroococcum* (HILL e KAVANAGH, 1980). O acoplamento da oxidação do substrato de carbono e o transporte de elétrons para a atividade da nitrogenase em *K. pneumoniae* envolve a transferência de elétrons para a piruvato flavodoxina oxidoreductase NifJ, seguido pela transferência de elétrons para a flavodoxina NifF que transfere elétrons para a proteína Fe da nitrogenase (HILL e KAVANAGH, 1980; DEISTUNG et al., 1985).

Em outros diazotrofos há evidências que sugerem que ferredoxinas atuam em uma cadeia de transporte de elétrons para a nitrogenase como em *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Azoarcus* sp. e *Rhodobacter capsulatus* (HAUSER et al., 2007; EDGREN e NORDLUND, 2005; EDGREN e NORDLUND, 2006; EGENER et al., 2001; JOUANNEAU et al., 1995).

Em *R. rubrum*, o transporte de elétrons para a nitrogenase se dá por duas vias: uma utilizando o produto dos genes *fix*, em condições heterotróficas e outra através de uma piruvato:ferredoxina oxidoreductase (*nifJ*), em condições anaeróbicas. Em ambos os sistemas, a ferredoxina FdxN parece ser o doador direto de elétrons para a Fe-proteína (EDGREN e NORDLUND, 2005; EDGREN e NORDLUND, 2006).

1.2 ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nifE mod* EM DIAZOTROFOS

A organização dos genes *nif* é bastante variada entre os diazotrofos. Os genes estruturais da nitrogenase (*nifHDK*) são transcritos como uma única unidade transcricional em organismos como em *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CORBIN, BARRAN e DITTA, 1983; KROL et al., 1982; LEE et al., 2000). Em alguns casos, os genes *nifHDK* são separados em dois operons (*nifH* e *nifDK*) como em *Bradyrhizobium japonicum* (FISCHER e HENNECKE, 1984). Em outros organismos o operon *nifHDK* é transcrito juntamente com outros genes como em *Azotobacter vinelandii*

(*nifHDKnifTYorf1orf2*) e *Azospirillum brasilense* (*nifHDKorf1nifY*) (JACOBSON et al., 1989; PASSAGLIA et al., 1991).

Em *A. brasilense* o maior grupo de genes *nif* está localizado em uma região de aproximadamente 40 kb formada por três operons: *nifHDKorf1nifY*, *nifENXorf3orf5fdxAnifQ* e *nifUSVorf4* (GALIMAND et al., 1989; FRAZZON e SCHRANK, 1998; POTRICH et al., 2001).

Em *K. pneumoniae*, os genes *nif* estão agrupados em oito unidades transcricionais, entre elas *nifHDKTY* e *nifENX* (MERRICK, 1992).

Em alguns organismos tais como *R. capsulatus*, *A. diazotrophicus* e *H. seropedicae* são encontrados também genes envolvidos na captação de molibdato pela célula (*modABC*) na região *nif* (WANG, ARGERMÜLLER e KLIPP, 1993; LEE et al., 2000; KLASSEN, 2000)

Em *R. capsulatus* os genes *modABC* estão localizados imediatamente a jusante dos genes *nifHDKnifU_{II}nifR4 nifA_{II}nifB_{II}*, em direção oposta e organizados em uma unidade transcricional juntamente com o gene *mopA* (*mopAmodABCD*). O gene *mopB* está localizado imediatamente a jusante de *mopA* e transcrito em direção oposta ao operon *mopAmodABCD* (WANG, ARGERMÜLLER e KLIPP, 1993).

A expressão dos genes *modABCD* de *R. capsulatus* não é somente controlada negativamente pelos níveis de molibdato, mas também é dependente da proteína NtrC. Esse ativador transcricional somente é ativo sob condições limitantes de nitrogênio e, portanto, o sistema de transporte de molibdato é expresso somente sob condições de desrepressão da nitrogenase (WANG, ARGERMÜLLER e KLIPP, 1993; KUTSCHE, et al., 1996).

A expressão da Fe-nitrogenase (*anfHFGK*) de *R. capsulatus* é reprimida por MoO_4^{2-} e amônio. Esta regulação se deve à repressão da transcrição do gene *anfA* que codifica um ativador transcricional específico dos genes estruturais desta nitrogenase alternativa (WIETHAUS et al., 2006).

As proteínas reguladoras dependentes de molibdato de *R. capsulatus*, MopA e MopB, possuem dois domínios Mop, similares ao domínio MopI da

proteína Mop de *Clostridium pasteurianum* na porção C-terminal, implicados com a ligação a molibdato (WANG, ANGERMÜLLER e KLIPP, 1993; WIETHAUS et al., 2006). Porém estas proteínas não são funcionalmente idênticas, apesar de ambas serem capazes de reprimir a transcrição dos genes *modABCD* e *anfA*. Também foram identificados em *R. capsulatus* uma proteína ligante de molibdato (Mop) e um sistema do tipo ABC de função desconhecida (MorABC) formado por dois operons transcritos divergentemente, *morAB* e *morC* e localizados em uma região distinta do genoma. Em altas concentrações de molibdato as proteínas MopA e MopB ligam ao oxianion e reprimem a transcrição de *morAB* e *morC*, porém somente a proteína MopA foi capaz de ativar dependentemente de molibdato a expressão de um gene do tipo *mop* presente em uma região distinta do genoma de *R. capsulatus* (WIETHAUS et al., 2006).

Dentre os organismos em que foram identificados genes de transporte de molibdato, somente os de *Anabaena variabilis*, *A. vinelandii*, *R. capsulatus*, *Staphylococcus carnosus* e *B. japonicum* foram clonados, identificados e caracterizados funcionalmente. Nestes organismos, com exceção de *R. capsulatus*, os genes *mod* não estão localizados em uma região associada aos genes *nif* (THIEL, PRATTE e ZAHALAK, 2002; WANG, ANGERMÜLLER e KLIPP, 1993; LUQUE et al., 1993; NEUBAUER et al., 1999; DELGADO et al., 2006). Nestes organismos molibdato é transportado por sistemas de alta afinidade e há indícios da presença de outros sistemas de baixa afinidade capazes de transportar também este oxianion (MOUNCEY, MITCHENALL e PAU, 1995; WANG, ANGERMÜLLER e KLIPP, 1993; ZAHALAK et al., 2004; DELGADO et al., 2006; NEUBAUER et al., 1999).

1.3 METABOLISMO DE MOLIBDATO

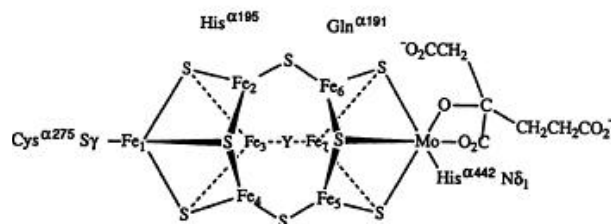
Molibdênio é um metal de transição necessário para a maioria dos organismos vivos. As poucas espécies que não necessitam de molibdênio requerem tungstênio, o qual apresenta características químicas semelhantes. Estes metais podem participar de sistemas de oxi-redução de transferência de um ou dois elétrons. As enzimas contendo estes metais são fundamentais na catálise de etapas-chave no metabolismo de carbono, nitrogênio e enxofre (HILLE, 2002).

O molibdênio é encontrado nos cofatores de enzimas sob a forma de centro multinuclear de ferro e molibdênio, como o cofator FeMo (FeMoco) (KIM e REES, 1992) (Figura 1A), presente na enzima nitrogenase, e principalmente na forma de centros mononucleares de molibdênio (Moco), presente nas demais molibdoenzimas (HILLE, 1996) (Figura 1B).

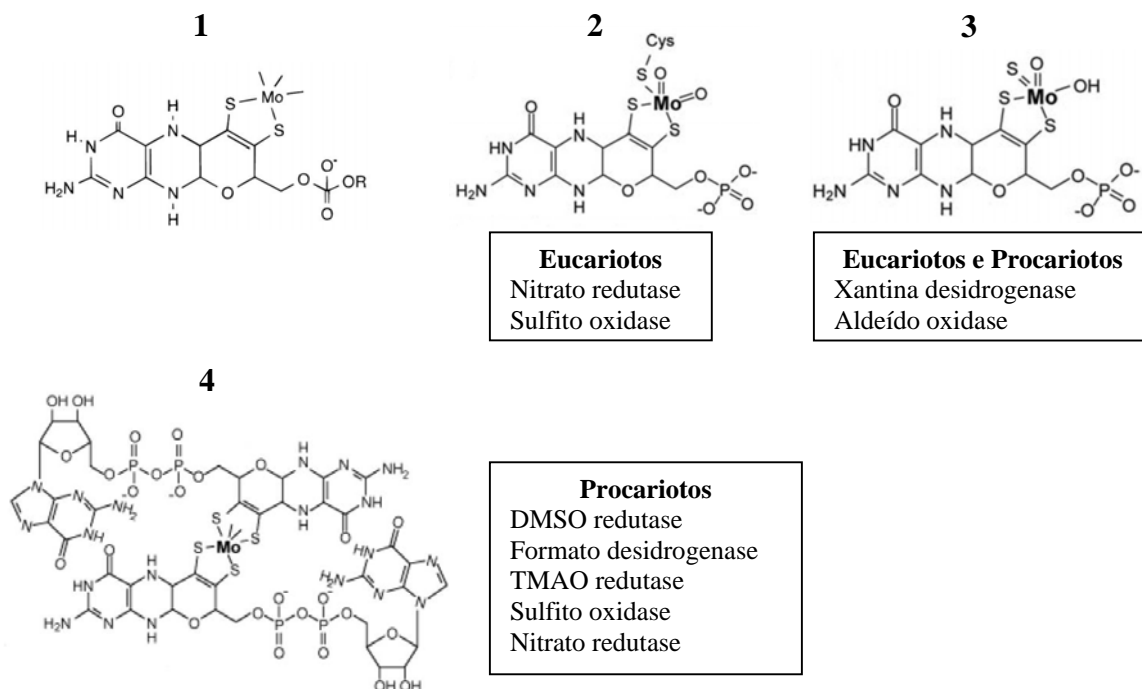
Em todos os casos de molibdoenzimas mononucleares conhecidas, o cofator, chamado de molibdopterina (MPT), apresenta uma estrutura básica (Figura 1B-1). Estas enzimas são classificadas em duas famílias com base na química de coordenação do Mo (Figura 1B-2 e 3). Em procariotos esse cofator pode sofrer modificações através da ligação de outros nucleotídeos ao grupo fosfato terminal do MPT, dando origem aos cofatores molibdopterina citosina dinucleotídeo (MCD), molibdopterina guanina dinucleotídeo (MGD), molibdopterina adenina dinucleotídeo (MAD) ou ainda bis-molibdopterina guanina dinucleotídeo (bis-MGD) (Figura 1B-4) (SCHWARZ, 2005; SCHWARZ e MENDEL, 2006).

FIGURA 1 - ESTRUTURA DOS COFADORES CONTENDO MOLIBDÊNIO

(A)



(B)



FONTES: KIM e REES, 1992; SCHWARZ, 2005; SCHWARZ e MENDEL, 2006.

- (A) Modelo do cofator FeMo (FeMoco) da nitrogenase de *A. vinelandii* (KIM e REES, 1992). Y provavelmente é um átomo de N (EINSLE et al., 2002).
- (B) Estrutura dos cofadores de molibdênio e suas respectivas enzimas descritas nos quadros. (1) estrutura básica do cofator pterina; (2) átomo de Mo é covalentemente ligado a um resíduo de cisteína conservado; (3) possui um terceiro enxofre (não protéico) ligado; (4) Mo bis-ditioleno coordenado; DMSO, dimetil sulfóxido; TMAO, trimetilamina *N*-óxido (HILLE, 1996).

1.3.1 Transporte de Molibdato em Bactéria

Transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) desempenham um papel central em muitos processos fisiológicos, facilitando a translocação de substratos através da membrana celular (LOCHER, 2004). Muito destes sistemas transportam moléculas associadas com proteínas ligantes presentes no periplasma de bactérias gram-negativas ou ancoradas na membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas (NIKAIDO e HALL, 1998).

Molibdênio, na forma de oxiânion molibdato (MoO_4^{2-}), é transportado para o interior das células bacterianas por um sistema de transporte do tipo ABC (LINTON e HIGGINS, 1998). O sistema de transporte de molibdato em bactéria é formado pela proteína ModA, proteína periplasmática capaz de ligar o íon molibdato; ModB, proteína integrante da membrana que forma um canal de passagem de MoO_4^{2-} e ModC, proteína que liga e hidrolisa ATP, fornecendo energia para o sistema de transporte (SELF et al., 2001).

Os transportadores ABC requerem proteínas periplasmáticas que se ligam aos solutos com alta afinidade e o dirigem para a face externa do transportador. Pequenos substratos chegam até o periplasma por difusão através de poros formados na membrana externa. Estes transportadores também possuem dois domínios transmembrana que formam um canal para translocação do soluto, e duas subunidades citoplasmáticas de ligação a nucleotídeo que hidrolisam ATP e dirigem o transporte. A ligação e hidrólise de ATP promovem mudanças conformacionais nos domínios transmembrana que permitem a passagem do soluto para o citoplasma. (NIKAIDO e HALL, 1998; DAVIDSON e CHEN, 2004).

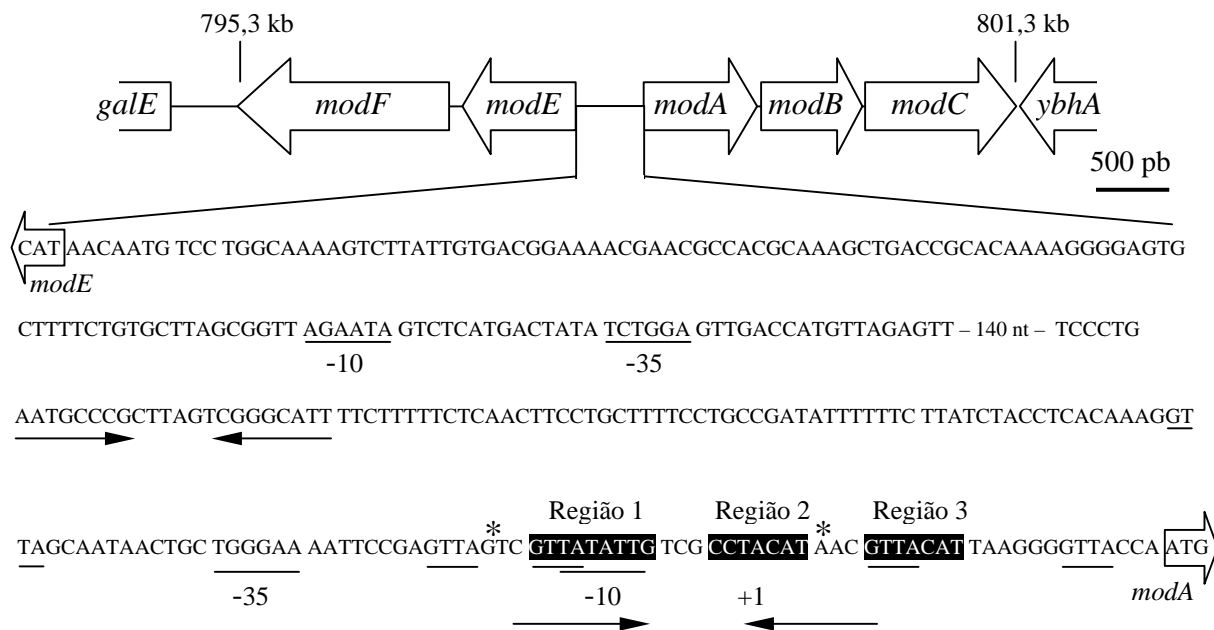
1.3.1.1 Sistema de transporte de molibdato e sua regulação em *E. coli*

Em *E. coli* os genes de transporte de molibdato e sua regulação estão organizados em dois operons (RILEY et al., 2006). Os genes estruturais deste sistema são codificados pelo operon *modABC*. A montante do gene *modA* e transcrevendo na direção oposta está o operon *modEF*, onde o produto do gene *modE* está envolvido na regulação do transporte de molibdato e *modF* possui função desconhecida (Figura 2) (MAUPIN-FURLOW et al., 1995; GRUNDEN et al., 1996; RILEY et al., 2006).

E. coli em condições de anaerobiose sintetiza um limitado número de molibdoenzimas. Normalmente não é necessária a suplementação de meios de cultivo com molibdato, pois o molibdato presente como contaminante de vários sais é suficiente para permitir a síntese destas enzimas (SELF et al., 2001). Sob condições limitantes, molibdato é transportado pelo sistema de alta afinidade ModABC com um K_m de ~26 nmol/L (CORCUERA, BASTIDAS e DUBOURDIEU, 1993).

Estudos genéticos e fisiológicos mostraram que o molibdato pode ser transportado em *E. coli* também pelo sistema de transporte de sulfato (*cysTWA*) e por um transportador de ânions inespecífico (ROSENTEL et al., 1995). A quantidade de molibdato necessária para a produção de níveis ótimos da molibdoenzima formato-hidrogênio-liase (FHL) foi dez vezes maior quando o sistema de transporte de sulfato foi utilizado por mutantes *mod*, comparada com a quantidade requerida pela estirpe selvagem. Estirpes mutantes *cysA*, *mod*⁺ foram incapazes de utilizar o sistema de transporte de molibdato para transportar sulfato. Quando cultivada em condições limitantes de molibdato, a qual permite a desrepressão do operon *mod*, a estirpe mutante *cysA* apresentou fenótipo *cys*⁺. Esses resultados mostram que molibdato e sulfato podem ser transportados por ambos os sistemas, mas o uso específico dos sistemas depende da regulação e da disponibilidade de um ou de outro ânion (ROSENTEL et al., 1995).

FIGURA 2 - SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO INTERGÊNICA ENTRE *modABC* E *modEF* DE *E. coli*.



FONTE: Adaptado de RECH, DEPPENMEIER e GUNSALUS, 1995; GRUNDEN e SHANMUGAM, 1997; GRUNDEN et al., 1999

Localização na região intergênica *modE-modABC* de seqüências importantes para a transcrição e regulação dos genes *modE* e *modABC* de *E. coli*. Estas regiões estão indicadas na figura e descritas como segue:

- Regiões 1, 2 e 3 são regiões protegidas da clivagem por Dnase I no complexo ModE-DNA;
- +1, sítio de início de transcrição;
- -35/-10, prováveis regiões promotoras de *modA* e *modE*;
- * assinalam as bases hiper-sensíveis à clivagem por Dnase I na presença de ModE;
- Setas indicam regiões de repetição invertida que podem formar uma estrutura em grampo;
- Os tetrâmeros GTTA estão indicados na figura.

Gene *modA* – O gene *modA* de *E. coli* codifica uma proteína de 257 aminoácidos. A sequência de aminoácidos N-terminal de ModA é similar a seqüências sinal encontradas em proteínas ligantes periplasmáticas (MAUPIN-FURLOW et al., 1995).

A proteína ModA de *E. coli* foi super-expressa e isolada do espaço periplasmático. ModA purificada teve sua extremidade N-terminal seqüenciada, revelando que os primeiros 24 aminoácidos N-terminais da pró-proteína ModA de 257 aminoácidos foi removido durante o processo de secreção da proteína madura para o periplasma. A proteína ModA madura (233 aminoácidos) apresentou massa molecular aparente determinado por SDS-PAGE de 22,5 kDa e a proteína nativa de 31,6 kDa estimada por gel permeação (RECH, WOLIN e GUNSALUS, 1996).

Ensaio de ligação da proteína ModA madura com diferentes oxiânions revelaram que esta proteína é capaz de ligar na forma monomérica com alta afinidade o molibdato e tungstato ($K_d = 20 \pm 0,8$ nmol/L), enquanto sulfato, cromato, selenato, fosfato e clorato não foram capazes de ligar mesmo em concentrações de 10 mmol/L (RECH, WOLIN e GUNSALUS, 1996; IMPERIAL, HADI e AMY, 1998). Estirpes mutantes de *E. coli* (*modC*), deficientes no transporte de molibdato, porém acumulando grandes quantidades de ModA madura no espaço periplasmático, foram utilizadas para a determinação da constante de dissociação de ModA *in vivo*. Neste ensaio a quantidade de molibdato ligado pela célula reflete a quantidade ligada pela proteína ModA, sendo determinado um $K_d = 67$ nmol/L (IMPERIAL, HADI e AMY, 1998).

A estrutura cristalina da proteína ModA de *E. coli* complexada a MoO_4^{2-} e WO_4^{2-} foi resolvida (HU et al., 1997). ModA é composta de dois domínios com conformações semelhantes, separados pela região de ligação ao oxiânion. Esses domínios são designados N- e C-terminal e o ânion molibdato/tungstato é posicionado na interface dos dois domínios, ligando à proteína como uma espécie tetraédrica (HU et al., 1997).

A especificidade da ligação da proteína ModA à molibdato e tungstato pode ser explicada pelo volume da cavidade de ligação ao oxianion. ModA de *E. coli* tem um volume de 80 \AA^3 , enquanto a proteína periplasmática de transporte de sulfato apresenta um sítio de ligação de 64 \AA^3 . As distâncias metal-oxigênio nas estruturas cristalinas de molibdato e tungstato são de $1,77 \text{ \AA}$ (GATEHOUSE e LEVERETT, 1969) e $1,78 \text{ \AA}$ (KOSTER, KOOLS e RIECK, 1969), respectivamente, comparada a $1,47 \text{ \AA}$ para o ânion sulfato (BAUR, 1964).

Gene *modB* – o gene *modB* de *E. coli* tem 690 pb e codifica uma proteína de 229 aminoácidos com massa molecular de 24,9 kDa predito a partir de sua seqüência de aminoácidos (MAUPIN-FURLOW et al., 1995).

A proteína ModB de *E. coli* é altamente hidrofóbica e possui cinco regiões transmembrana distintas e uma seqüência (EQAA) característica dos componentes permease dos sistemas ABC, localizada em uma alça citoplasmática entre as regiões transmembrana 3 e 4 (MAUPIN-FURLOW et al., 1995; SELF et al., 2001).

Análise comparativa das seqüências de aminoácidos de 19 proteínas ModB homólogas revelaram duas regiões similares adicionais. A primeira região está localizada entre os aminoácidos 53 e 66 de ModB de *E. coli*, presente no segundo domínio transmembrana, cuja seqüência consenso é LPLVLPP(V/T/S)VhG(F/Y)XL, onde h representa um aminoácido hidrofóbico e X, qualquer aminoácido. A segunda seqüência consenso, FAR(S/T)LGFEFG(A/V)(T/V), está localizada entre os aminoácidos 157 e 167 em ModB de *E. coli* (SELF et al., 2001).

Gene *modC* – o gene *modC* codifica uma proteína de 352 aminoácidos com massa molecular de 37,5 kDa (MAUPIN-FURLOW et al., 1995). A proteína ModC possui quatro motivos que são conservados na seqüência primária de 94 ATPases do tipo ABC de *E. coli*. São eles: motivos Walker A e B, diretamente envolvidos na ligação e hidrólise de ATP; a assinatura ABC (LSGGQ) e um motivo contendo uma

histidina conservada, normalmente precedida por quatro resíduos hidrofóbicos e seguida por um resíduo carregado (MAUPIN-FURLOW et al., 1995; GRUNDEN e SHANMUGAM, 1997; LINTON e HIGGINS, 1998; SELF et al., 2001).

Os genes *modABC* são expressos em baixo nível na estirpe selvagem e traços de molibdato presente nos meios de cultivo são suficientes para reprimir completamente a expressão deste operon. A regulação do transporte de molibdato em *E. coli* é dependente da concentração de molibdato, uma vez que condições limitantes deste oxianion levam a um aumento no nível de expressão do sistema. Oxigênio e nitrato não exerceram qualquer efeito na expressão destes genes. Estirpes deficientes no transporte de molibdato (*modC*) tiveram a expressão dos genes de transporte aumentada cerca de 40-60 vezes (RECH, DEPPENMEIER e GUNSALUS, 1995). Este efeito também foi observado em uma estirpe mutante *modA::lacZ* sob condições de limitação de molibdato. Esta estirpe apresentou alto nível de expressão do gene *modA* e ausência de atividade da molibdoenzima formato desidrogenase (FHL). Complementando este mutante com os genes *modABC*, houve baixa expressão de β -galactosidase independente da presença de molibdato, mostrando que traços de molibdato no citoplasma são suficientes para a atividade da molibdoenzima FHL e repressão do operon *modABC* (GRUNDEN et al., 1996). A regulação da expressão de genes *modABC* é exercida pela proteína repressora ModE. Esta proteína é codificada pelo gene *modE* localizado a montante de *modA* e transcrita na orientação oposta (GRUNDEN et al., 1996; ANDERSON et al., 1997) (Figura 2). Experimentos usando um mutante *modE* contendo uma fusão *lacZ* indicou que o gene *modE* é expresso constitutivamente em baixos níveis e que sua expressão não é afetada pelos reguladores transcricionais Fnr, ArcA e NarL. Mutações nos genes requeridos para biossíntese de molibdopterina, *moa*, *mob*, *moe* e *mog*, também não resultaram em mudanças na expressão de *modE* (GRUNDEN et al., 1996).

A repressão da transcrição dos genes *modABC* ocorre através da ligação da proteína ModE na região promotora destes genes (GRUNDEN et al., 1996). Análise da sequência da região a montante do gene *modA* em ensaios de *footprinting* com DNase I e mutações sítio-dirigidas nesta região definiram as posições exatas de ligação da proteína ModE em *E. coli* (RECH, DEPPENMEIER e GUNSALUS, 1995; GRUNDEN et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; McNICHOLAS, RECH e GUNSALUS, 1997; GRUNDEN et al., 1999) (Figura 2).

Ensaios de *footprinting* revelaram três regiões de DNA protegidas por ModE, GTTATATTG (-15 a -7, região 1), GCCTACAT (-4 a +4, região 2) e GTTACAT (+8 a +14, região 3). Ensaios de mobilidade em gel mostraram que as regiões 1 e 2 são essenciais para a ligação do complexo ModE-molibdato ao DNA e que a região 3 aumenta a afinidade desta ligação. Na região 1 há a presença de uma repetição invertida, GTTA, separado por uma base T. Esse tetrâmero, ou uma variação dele, é encontrado 9 vezes na região operadora/promotora do operon *modABC* (ANDERSON et al., 1997; GRUNDEN e SHANMUGAM, 1997; GRUNDEN et al., 1999; SELF et al., 2001).

Ensaios *in vitro* de ligação da proteína ModE à região promotora de *modA* revelaram que a ligação ocorre na presença ou ausência de oxigênio e a adição de molibdato aumentou significativamente a ligação ao DNA (McNICHOLAS, RECH e GUNSALUS, 1997).

Análises *in silico* de genomas sequenciados revelaram que o gene *modE* é encontrado em Archaea e Bacteria e a sequência de reconhecimento da proteína ModE é também conservada entre esses dois domínios (STUDHOLME e PAU, 2003).

1.3.1.2 Proteína ModE

A proteína ModE é um regulador transcricional capaz de sensoriar os níveis intracelulares de molibdato e regular a transcrição dos operons envolvidos com o transporte e utilização deste oxianion (GRUNDEN et al., 1996; McNICHOLAS CHIANG e GUNSALUS, 1996; McNICHOLAS, RECH e GUNSALUS, 1997; TAO et al., 2005).

Análise das seqüências de aminoácidos revelou que estas proteínas possuem um domínio hélice-volta-hélice (HTH) na região N-terminal e dois sub-domínios denominados MopI e MopII na região C-terminal (Figura 3A). Na maioria dos casos os organismos possuem apenas uma proteína homóloga a ModE, porém foram identificados em alguns genomas seqüenciados mais de uma proteína deste tipo (STUDOLME e PAU, 2003).

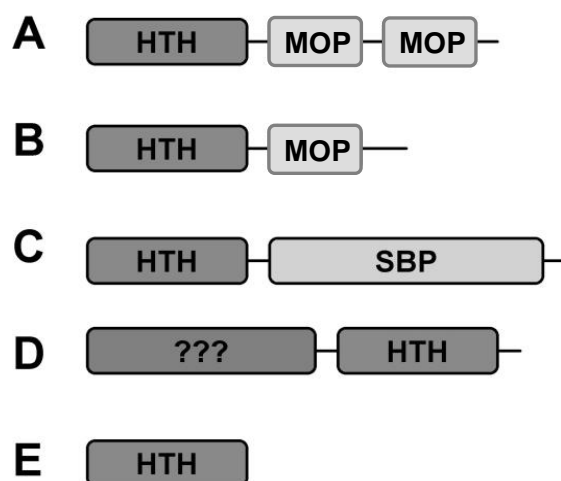
As Archaeas metanogênicas *Methanosarcina mazei* (Q8PWN4) e *Methanosarcina acetivorans* (Q8TTZ2) codificam uma proteína do tipo ModE que possui somente um sub-domínio Mop C-terminal (Figura 3B). Bactérias como *Ralstonia eutropha* (Q9RBF7), *Ralstonia solanacearum* (Q8XXMI) e *Pyrobaculum aerophilum* (Q8ZZY3) codificam proteínas contendo o domínio HTH característico de ModE na porção N-terminal, possuindo na região C-terminal um domínio SBP (Figura 3C). Membros desta família ligam a diversos solutos como açúcares, peptídeos e íons inorgânicos (STUDHOLME e PAU, 2003).

Reguladores transcricionais contendo o domínio HTH exibem uma correlação entre a posição e a função deste domínio em Bacteria e Archaea. Em proteínas que atuam como repressoras ou com dupla função repressora/ativadora, o domínio HTH tende a estar posicionado na região N-terminal, enquanto ativadores tendem a ter o domínio HTH na região C-terminal (PÉREZ-RUEDA e COLLADO-VIDES, 2001). Como a proteína ModE pode atuar tanto como repressora quanto ativadora, o domínio HTH está posicionado na região N-terminal (STUDHOLME e PAU, 2003). Em contraste, *Campylobacter jejuni* (Q9PMF6) apresenta uma ORF

(1507c) com o domínio HTH no C-terminal, sugerindo uma função de ativadora transcricional (Figura 4D). Esta *orf* sobrepõe o gene *fdhD*, o qual codifica a molibdoenzima formato desidrogenase, sugerindo uma ligação funcional entre essa proteína regulatória e o metabolismo de molibdênio (STUDHOLME e PAU, 2003).

Também são encontrados organismos que codificam proteínas contendo apenas o domínio HTH N-terminal sem apresentar qualquer domínio para ligação a molibdato ou qualquer outro soluto (Figura 3E). São eles *Salmonella typhimurium* ([NP_459758](#)), *Agrobacterium tumefaciens* (NP_533229), *Sulfolobus solfataricus* (Q97Z66), *Sulfolobus tokodaii* (Q97ET9), *Pseudomonas aerophilum* (Q8ZYE6), *Archaeoglobus fulgidus* (O29240), *Methanopyrus kandleri* (Q8TVF9) e *Rhizobium loti* (Q98K14) (STUDHOLME e PAU, 2003).

FIGURA 3 - ARRANJO DOS DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS DO TIPO ModE DESCRITAS



FONTE: adaptado de STUDHOLME e PAU, 2003

Arranjo esquemático dos domínios presentes em proteínas do tipo ModE, conforme descrito no texto. HTH indica domínio hélice-volta-hélice; MOP indica o sub-domínio responsável pela ligação a molibdato; SBP indica um domínio relacionado com a ligação de diferentes solutos. Proteínas representadas pelo esquema D apresentam na região N-terminal um domínio de função desconhecida.

A proteína ModE de *E. coli* foi cristalizada e sua estrutura resolvida nas formas de apoproteína (não ligada a molibdato) ou complexada a molibdato (número de acesso PDB: 1H9S, 1H9R, 1O7L, 1B9M) (HALL et al., 1999; GOURLEY et al., 2001; SCHÜTTELKOPF, BOXER e HUNTER, 2003).

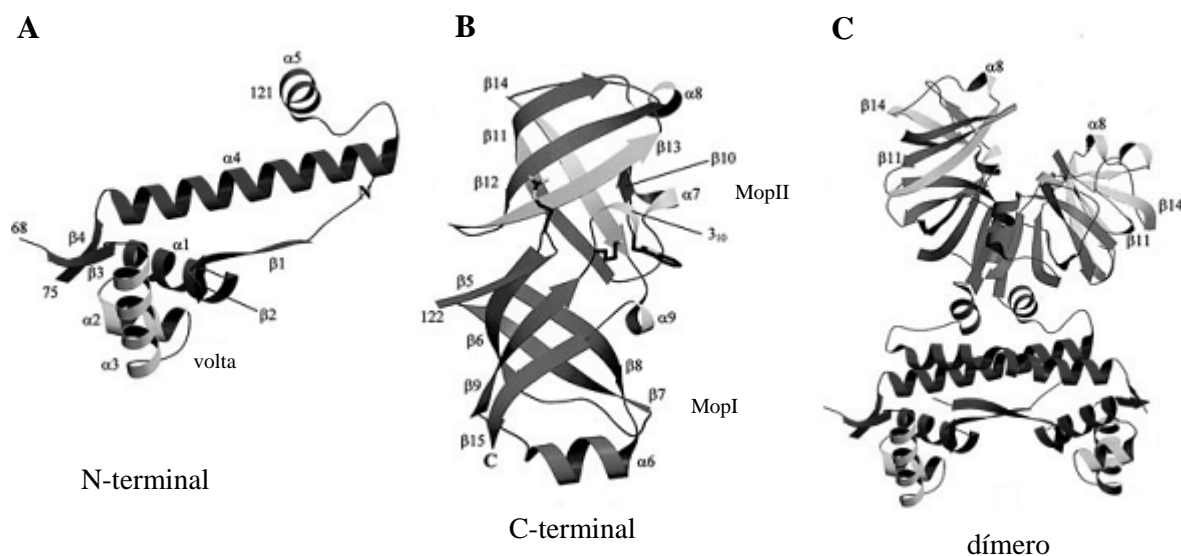
O domínio de ligação a DNA (N-terminal) é composto por 60% de α -hélices e 20% de folhas β , sendo o motivo HTH formado pelas estruturas secundárias α_2 , α_3 , β_3 e β_4 (Figura 4A). O domínio C-terminal (DiMop) é composto principalmente por folhas β (60%). Os sub-domínios Mop possuem conformações similares do tipo OB (*oligonucleotide/oligosaccharide binding fold*) formados por 5 folhas β em forma de β -barril e uma α -hélice na base deste barril (Figura 4B) (HALL et al., 1999; MURZIN, 1993).

A proteína ModE discrimina os oxianions baseado nos seus tamanhos e cargas, sendo capaz de ligar somente a molibdato e a tungstato a uma estequiometria de dois oxianions por dímero, porém a afinidade de ModE-tungstato pela região promotora de *modA* apresentou K_d seis vezes maior do que a de ModE-molibdato (GRUNDEN et al., 1999). A capacidade de discriminar oxianions com base na carga e tamanho também foi observado na proteína ModA de *E. coli*. Nesta proteína o volume observado do sítio de ligação de oxianion é de aproximadamente 80 \AA^3 , compatível com o volume do sítio de ligação de oxianion de ModE (78 \AA^3) (GRUNDEN et al., 1999; GOURLEY et al., 2001).

Ensaio *in vivo* indicam que a ligação de ModE à molibdato aumenta a afinidade ao DNA (ANDERSON et al., 1997), e as comparações das estruturas da proteína nas formas apo e ligada indicam mudanças estruturais na superfície de interação com o DNA, alterando a afinidade de ModE pelo DNA. A interação entre a proteína ModE de *E. coli* e a região promotora de *modA* apresentou um $K_d \sim 0,3$ nmol/L, aumentando para 8 nmol/L na ausência de molibdato. Na forma ligada a molibdato, as duas hélices do motivo HTH são posicionadas de maneira a serem inseridas nos dois sulcos maiores consecutivos do DNA, interagindo com a

seqüência palindrômica de reconhecimento de ModE, e as regiões das folhas $\beta 3$ e $\beta 4$ interagem com o sulco menor entre os dois sulcos maiores consecutivos (GRUNDEN et al., 1999; HALL et al., 1999; SCHÜTTELKOPF, BOXER e HUNTER, 2003).

FIGURA 4 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA ModE DE *E. coli*



FONTE: HALL et al., 1999 (número de acesso PDB: 1B9M).

(A) indica a estrutura do domínio N-terminal, contendo o motivo HTH formado pelas hélices $\alpha 2$ e $\alpha 3$ e a volta entre elas. (B) indica a estrutura do domínio C-terminal, com os subdomínios Mop indicados na figura. (C) indica o dímero da proteína ModE. A estrutura apresentada foi obtida com resolução 2,1Å.

1.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLIBDOENZIMAS EM *E. coli*

E. coli pode respirar aerobica e anaerobicamente usando uma variedade de aceptores finais de elétrons acoplados a fosforilação oxidativa. Esses compostos incluem, em ordem decrescente de potencial de redução, oxigênio, nitrato, dimetil sulfóxido (DMSO), trimetilamina-*N*-óxido (TMAO) e fumarato (INGLEDEW e POOLE, 1984). Sob condições de crescimento anaeróbico *E. coli* produz muitas molibdoenzimas e muitas delas servem como enzimas terminais na respiração anaeróbica. Assim, além de repressor dos genes de transporte de molibdato, o complexo ModE-molibdato também é capaz de aumentar a expressão dos genes que codificam muitas dessas molibdoenzimas, como *fdhF* (formato desidrogenase-H; FDH-H), *hyc* (hidrogenase 3, parte do complexo da formato-hidrogênio-liase em adição a FDH-H), que são componentes da respiração anaeróbica, e *narXL* (reguladores da nitrato redutase respiratória), além das enzimas requeridas para a síntese do cofator molibdopterina (*moaABCDE*) (SELF et al., 2001).

Outro aceptor final de elétrons na respiração anaeróbica em *E. coli* é dimetilsulfóxido (DMSO). Sua respectiva redutase (DMSO redutase) é codificada pelo operon *dmsABC*. A expressão deste operon é aumentada em resposta a condições de anaerobiose (Fnr) e reprimida na presença de nitrato (NarL). Outros aceptores finais de elétrons como trimetilamina *N*-óxido (TMAO) e fumarato não exercem efeito algum na expressão do operon *dms*. Foi demonstrado que a completa repressão do operon *dms* por nitrato exigiu a presença de molibdato (COTTER e GUNSALUS, 1989).

Estudos *in vitro* revelaram que a proteína ModE interage com a região promotora do gene *dmsA*, cuja expressão também é dependente das proteínas Fnr, NarL e RNA polimerase. Ensaio *in vitro* revelaram que a proteína IHF é capaz de ligar à região promotora do operon *dmsABC* e ensaios *in vivo* mostraram que IHF é importante para a regulação dependente de molibdato deste operon (McNICHOLAS, CHIANG e GUNSALUS, 1998).

O perfil de expressão gênica global de *E. coli* estirpes selvagem e duplo mutante *modE*, *moeA* (MoeA é necessário para a ativação dos operons *nar*, *fdhF* e *hyc*) em condições de anaerobiose revelaram 67 genes diferencialmente expressos, sendo 33 destes expressos em maior quantidade na estirpe duplo mutante e 34 expressos em maior quantidade na estirpe selvagem. Além dos genes conhecidos por serem regulados por molibdato, dois operons que codificam proteínas envolvidas na via de utilização de deoxirribose (*deoCABD*) e transporte de oligopeptídeo (*oppABCDF*) tiveram suas expressões aumentadas na estirpe duplo mutante *modE*, *moeA* (TAO *et al.*, 2005).

O nível de mRNA do gene *oppA* foi demonstrado ser 19 vezes maior em uma estirpe de *E. coli* mutante *modE* quando comparada com a estirpe selvagem. Este resultado mostra que o operon *opp* está sujeito a um controle transcricional dependente de molibdato (TAO *et al.*, 2005).

Experimentos de RT-PCR quantitativa revelaram que o nível de mRNA de *deoC* foi levemente maior nas estirpes mutantes *modE* ou *moeA* (~1,7 vezes) quando comparadas com a estirpe selvagem. Porém, na estirpe duplo mutante *modE*, *moeA*, esse aumento foi de 25 vezes. Estes resultados foram confirmados por análise de uma fusão *deoC-lacZ* que mostrou aumento de 4 vezes na atividade de β -galactosidase. Um aumento de aproximadamente 5 vezes na atividade de β -galactosidase foi observado na estirpe mutante *modE*, revelando que a regulação de *deoC* deve-se principalmente à proteína ModE e a contribuição da proteína MoeA é pequena. A diferença na indução de mRNA comparada com a atividade de β -galactosidase pode ser resultado de um complexo controle da expressão do operon *deo* por outras proteínas como DeoR, CytR e CRP-cAMP. Ensaio de mobilidade eletroforética revelaram que a proteína ModE é capaz de ligar na região a montante do operon *deo* (TAO *et al.*, 2005).

Os sítios de ligação da proteína ModE de alguns organismos na região a montante de genes relacionados com a síntese e regulação de molibdoenzimas, determinados *in vivo* e *in vitro*, estão indicados na figura 5.

FIGURA 5 - SEQUÊNCIA DE ALGUNS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE ModE

	1	2	3
<i>Ec modA(-)</i>	GT TATAT TGTCGCC	TACATA AACGT	TACAT
<i>Ec moaA(+)</i>	GACGCT TATAT ACATGAT	TACAT AGCGAA	
<i>Ec narK(+)</i>	TTGCCGTGTG GTTA GTGCGTT	TACAT CGGT	
<i>Ec hyc(+)</i>	CAGAGG GTTA TTTCGTG	CATAT CGCCT	
<i>Ec napF(+)</i>	ATCGCT TATATA AAATATATT	TATAAC CATTT	
<i>Ec dms(-)</i>	NTCGA TGTATA CAAGCCT	TATATA GCGAAC	
<i>Ec torY(+)</i>	NNCGT TATAT ANNNNNN	TATATA AACG	
<i>Ec opp(-)</i>	NNNNN TATAG NNNNNNN	TACGC	
	NNNNN TGTGC NNNNNNN	TACTG	
<i>Ec deo(-)</i>	NNNNN TGTGT NNNNNNN	TGTGT	
<i>Ec orf(?)</i>	NNNNN TATAT NNNNNNN	TAYAT	
	NNNNN TGTGT NNNNNNN	TGYGT	
<i>Rc mopA(-)</i>	AT CGCTATTA GTCGGGTC	TATATAACG AT	
<i>Rc morA(-)</i>	CGCTATAA GGTTGGAC	TACATAGCG NNNN	
<i>Rc morC(-)</i>	CGCTATGT AGTCCAAC	CTTATAGCG NNNN	
<i>Rc anfA(-)</i>	TGGT TATAT GGAATCAC	TATAT AT CGATN	
<i>Av modE(?)</i>	TGCTT TATATA AAACTGGATAAA	TAGATAAA ATTG	
<i>Av modG(?)</i>	GACAA TTTATA CTGCNNNNAATG	ATATAGCGGT	
<i>Av anfA(-)</i>	GCGT TATATA GACATA	TATATA TCGATNNNNNNN	
<i>Av vnfA(-)</i>	AGCGT TATAT TACNNNNNGAAT	TATATA GCGCTN	
<i>Mm orf1(?)</i>	TGGCGT TATGT TTATTTA	AACATA AACGAT	
<i>Mm orf2(?)</i>	ATTAGG TTTATA AAGTCAA	TAAAT AATGAA	
<i>Ma orf1(?)</i>	TATGGT TATGT AATTCTA	AACATA AACGAA	
<i>Ma orf2(?)</i>	AATCGT TATGT TTAGGTA	TACATA AACTA	
<i>Ma orf3(?)</i>	ATTCGT TATGT TTAGAAT	TACATA AACCAT	
<i>Ma orf4(?)</i>	TGTCGT TATGT TTATTTA	AACATA AACGGT	

Sequências invertidas repetidas localizadas a montante dos genes *modA* (RECH, DEPPENMEIER e GUNSALUS, 1995), *moaA* (ANDERSON et al., 2000), *narK*, *hyc* (SELF et al., 1999), *napF* (McNICHOLAS e GUNSALUS, 2002), *dmsA* (McNICHOLAS, CHIANG e GUNSALUS, 1998), *torY*, *oppA*, *deoC*, *orf* (*xapR*, *sdaA*, *yiaT*, *yafN*, b2654, *yfeU*, *yifM_1*, b1368, b2107, *yijP*, *yiaT*, *yicE*, *yfeT*, *ybfB*, *yecG*, *ybgD*, *yigF*, b1501) (TAO et al., 2005) de *E. coli* (*Ec*); *mopA*, *morA*, *morC*, *anfA* de *R. capsulatus* (*Rc*); *modE*, *modG*, *anfA*, *vnfA* de *A. vinelandii* (*Av*) (KUTSCHE et al., 1996); *orf1-2*, formilmetanofurano desidrogenase contendo Mo (subunidade E), proteína G de síntese de cobalamina de *Methanosarcina mazei* (*Mm*) e *orf1-4*, *vnfH* (proteína Fe), *modA*, *nifII*, formilmetanofurano desidrogenase contendo Mo (subunidade E) de *Methanosarcina acetivorans* (*Ma*) (STUDHOLME e PAU, 2003). N, nucleotídeo (A, T, C ou G). (+) ativação e (-) repressão da transcrição.

1.5 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma β -Proteobacteria endofítica, gram-negativa, encontrada associada a várias gramíneas de interesse econômico como milho, arroz, cana-de-açúcar e abacaxi (BALDANI et al., 1986; YOUNG, 1992; CRUZ et al., 2001).

Esta bactéria possui um metabolismo típico respiratório e não fermenta açúcares. Utiliza ácidos orgânicos como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato e trans-aconitato como fontes preferenciais de carbono. Manitol, sorbitol, glicerol e açúcares como glucose, galactose e L-arabinose também são oxidados (BALDANI et al., 1986).

H. seropedicae é capaz de fixar nitrogênio atmosférico em condições microaeróbicas, apresentando bom crescimento na presença de N_2 como única fonte de nitrogênio. A avaliação do efeito de compostos de nitrogênio no crescimento e atividade da nitrogenase em *H. seropedicae* revelou que L-glutamato ou L-glutamina como únicas fontes de nitrogênio sustentaram o crescimento da bactéria, porém a atividade da nitrogenase foi dependente da depleção destes componentes no meio de cultura. L-serina, L-arginina ou cloreto de amônio também permitem o crescimento, mas não foi observada atividade da nitrogenase. Entretanto, L-histidina, L-lisina, cloreto de metilamônio, cloreto de tetrametilamônio ou etilenodiamina não foram capazes de sustentar o crescimento de *H. seropedicae* (KLASSEN et al., 1997).

A inibição da atividade da nitrogenase por íons amônio e outras fontes de nitrogênio (glutamato, glutamina, alanina e serina) ocorre independentemente de ADP-ribosilação, provavelmente pela alteração do suprimento de elétrons para a nitrogenase causado pelo transporte desses compostos (FU e BURRIS, 1989; KLASSEN et al., 1997).

A regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* envolve o ativador transcricional NifA, o qual ativa a transcrição dos genes *nif* (SOUZA et al., 1991a e

b). A expressão do promotor *nifA* é regulada pelo ativador transcricional NtrC e é dependente de RpoN (σ^N) (SOUZA et al., 2000), enquanto que a atividade da proteína NifA é controlada por oxigênio, íons amônio (SOUZA et al., 1999) e pela proteína PII (BENELLI et al., 1997).

Os genes *nif* em *H. seropedicae* estão distribuídos em vários operons em uma região de aproximadamente 36 kb do genoma (www.genopar.org). Os genes estruturais da nitrogenase (*nifHDK*) são transcritos a partir de um promotor do tipo RpoN (σ^N)-dependente. Esta região promotora possui dois sítios para ligação de NifA e um sítio para ligação de IHF (MACHADO et al., 1996). A jusante dos genes *nifHDK* e fazendo parte do mesmo operon estão os genes *nifENXorf1orf2* (KLASSEN et al., 1999). Os produtos dos genes *nifX* e *orf1* são essenciais para a atividade máxima da nitrogenase em condições de limitação de ferro, indicando a participação destas proteínas na biossíntese dos grupos metálicos da nitrogenase (KLASSEN et al., 2003). Na região a jusante de *nifHDKENXorf1orf2* são encontrados os genes *fdxA* (ferredoxina do tipo 2[4Fe-4S], seguido por *nifQmodA1B1C1* (KLASSEN, 2000, SOUZA, 2003).

Além do grupo de genes envolvidos no transporte de molibdato, *modA1B1C1*, localizados na região *nif*, um gene do tipo *modE* (*modE1*) (VOIGT, 2000), regulador transcricional dependente de molibdato dos genes *modABC*, está localizado imediatamente a montante do gene *nifA*, 14,6 kb a montante do gene *nifH*. Também foi anotado um segundo grupo de genes de transporte de molibdato (*modA2B2C2*). Este grupo está localizado em uma região distinta do genoma contendo o gene *modE2* imediatamente à montante e transcrevendo na direção oposta ao gene *modA2*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcionalmente os genes *fdxA* e *modB2* e as proteínas ModE1 e ModE2 de *H. seropedicae*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter mutantes nos genes *fdxA* e *modB2* com a inserção sítio dirigida do cassete *lacZ*-Km;
- Determinar o fenótipo *nif* dos mutantes *fdxA* e *modB2* obtidos;
- Clonar, superexpressar e purificar as proteínas ModE1 e ModE2;
- Analisar a capacidade de ligação das proteínas ModE1 e ModE2 à região promotora do gene *modA2*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizados estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1 - BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS

BACTÉRIA	ESTIRPE	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	SMR1	Selvagem, Nif ⁺ , Sm ^R	PEDROSA et al., 1997
	KC6	SMR1, <i>fdxA::lacZ</i> -Km (mesma orientação de <i>fdxA</i>), Sm ^R , Km ^R	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	Estirpe hospedeira para amplificação de plasmídeos, Sm ^R	GRANT et al., 1990
	BL21(DE3)	Estirpe hospedeira para expressão das proteínas His-ModE1 e His-ModE2	Novagen, Darmstadt, Alemanha
Vetor			
pPW452		Tc ^R , <i>lacZ</i> sem promotor; vetor para fusão	P. WODLEY
pMP220		Tc ^R , <i>lacZ</i> sem promotor; vetor para fusão	SPAINK et al., 1987
pSUP202		Ap ^R , Cm ^R , Tc ^R , <i>mob</i>	SIMON PRIEFER e PÜHLER, 1983
pKOK6.1		Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , <i>lacZ</i> sem promotor	KOKOTEK E LOTZ, 1989
pET-28a(+)		Vetor de expressão contendo cauda His; Km ^R	Novagen, Darmstadt, Alemanha
pCR [®] 2.1		Vetor de clonagem TA, fragmento <i>lacZα</i> , Km ^R , Ap ^R	Invitrogen, Carlsbad, EUA
Plasmídeos		Vetor	Propriedades
HS05-MF-037-A04	pUC18	Fragmento <i>nifX</i> (5')- <i>nifQ</i> (5') de <i>H. seropedicae</i>	Genopar ^a
HS25-MF-013-D09	pUC18	Fragmento <i>orf1</i> (5')- <i>modA1</i> (5') de <i>H. seropedicae</i>	Genopar ^a
HS05-EG-048-B06	pUC18	Fragmento de 1,5 kb contendo os genes <i>modA2</i> e parte de <i>modB2</i> de <i>H. seropedicae</i>	Genopar ^a

TABELA 1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS - continuação

PLASMÍDEO	VETOR	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
pMPnifX-nifQ	pMP220	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI contendo <i>nifXorf1orf2fdxAnifQ</i> de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pPWorf1-modA1	pPW452	Fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Pst</i> I contendo <i>orf1orf2fdxAnifQmodA1</i> de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pALFSA	pSUP202	Fragmento de 1,2 kb contendo o gene <i>fdxA</i> clonado no sítio <i>Eco</i> RI do plasmídeo pSUP202	Este trabalho
pALFKC	pSUP202	Fragmento de 1,2 kb contendo o gene <i>fdxA</i> com o casete <i>lacZ</i> -Km inserido no sítio <i>Nsi</i> I de <i>fdxA</i> na mesma orientação do gene	Este trabalho
pALFAB	pSUP202	Fragmento de 1,5 kb contendo parte do gene <i>modB2</i> clonado nos sítios <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I do plasmídeo pSUP202	Este trabalho
pABKC	pSUP202	Fragmento de 1,5 kb contendo parte do gene <i>modB2</i> com o casete <i>lacZ</i> -Km inserido no sítio <i>Nsi</i> I de <i>modB2</i> na mesma orientação do gene	Este trabalho
pCR2.1modE1	pCR [®] 2.1	pCR [®] 2.1 contendo o produto de PCR <i>modE1</i>	Este trabalho
pCR2.1modE2	pCR [®] 2.1	pCR [®] 2.1 contendo o produto de PCR <i>modE2</i>	Este trabalho
pET28amodE1	pET-28a(+)	pET-28a(+) contendo o gene <i>modE1</i> <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pET28amodE2	pET-28a(+)	pET-28a(+) contendo o gene <i>modE2</i> <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho

^a Projeto de seqüenciamento genômico de *H. seropedicae* (www.genopar.org).

3.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados no cultivo de estirpes de *E. coli* foram LB (*Luria Broth*) (MILLER, 1972), SOB (SAMBROOK, FRITSCH E MANIATIS, 1989) e SOC (HANAHAN, 1983). A composição destes meios está descrita na Tabela 2.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA DE *E. coli*

CONSTITUINTES(g/L)	LB*	SOB*	SOC*
Triptona	10	20	20
Extrato de levedura	5	5	5
NaCl	10	0,5	0,5
KCl	-	0,186	0,186
MgCl ₂	-	-	0,94
MgSO ₄	-	-	1,2
Glucose	-	-	3,6

* O pH foi ajustado para 7,0 com a adição de gotas de NaOH 0,1 mol/L e os meios foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, a 121°C e 1 atm.

O meio sólido LA foi preparado pela adição de 15 g/L de agar ao meio LB. As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP (KLASSEN et. al., 1997) (Tabela 3)

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NFbHP*

COMPOSIÇÃO	CONSTITUINTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Macronutriente	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
	NaCl	0,1
	CaCl ₂	0,02
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
	Titriplex I**	0,056
	KH ₂ PO ₄	7,975
	K ₂ HPO ₄	0,89
Micronutriente	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,0×10 ⁻³
	MnSO ₄ .H ₂ O	2,35×10 ⁻³
	H ₃ BO ₃	2,8×10 ⁻³
	CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0×10 ⁻⁵
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4×10 ⁻⁴
Vitamina	Biotina	1,0×10 ⁻⁴
Suplemento orgânico	Malato	5,0

* O pH foi ajustado para 6,5 com solução de KOH 70% (p/v) e o meio foi esterilizado em autoclave durante 20 minutos, a 121°C e 1 atm. KH₂PO₄ e K₂HPO₄ foram adicionados no momento do uso.

** ácido nitrilo triacético

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 20 mmol/L. Para a preparação do meio NFbH semi-sólido foi adicionado 0,175% de agar ao meio líquido. O meio NFbHP isento de molibdato foi preparado utilizando-se os sais diluídos em água ultra pura tratada com carvão ativo como descrito (SCHNEIDER et al., 1991).

3.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados para seleção de estirpes de *E. coli* e *H. seropedicae* estão listados na Tabela 4. Os antibióticos ampicilina (em forma de sal de sódio), estreptomicina e canamicina (em forma de sulfato) foram dissolvidos em água e esterilizados por filtração (0,22 μm) e conservados a -20°C (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

TABELA 4 - ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA SELEÇÃO DE *E. coli* E *H. seropedicae*.

ANTIBIÓTICO	<i>E. coli</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>H. seropedicae</i> ($\mu\text{g/mL}$)	SOLUÇÃO-ESTOQUE (mg/mL)
Ampicilina(Ap)	250	-	250
Canamicina(Km)	50	500/1000	100
Estreptomicina(Sm)	20	80	80

3.4 ESTOCAGEM

Estoques de *E. coli* foram mantidos em glicerol 50% (v/v) a -20°C e de *H. seropedicae* foram mantidos sob a mesma condição e em meio NFbHP semi-sólido contendo 20 mmol/L NH_4Cl e antibióticos apropriados, à temperatura ambiente.

3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA

3.5.1 Mini-preparação de Plasmídeos

A preparação de plasmídeos em pequena escala foi feita por lise alcalina, baseada no método descrito por SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989).

Uma colônia da bactéria contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 3 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado e incubado a 37°C sob agitação (120 rpm) por aproximadamente 16 horas. Um volume de cultura de 1,5 mL foi transferido para um tubo de microcentrífuga e as células foram coletadas por centrifugação a 15.000×g, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. O meio foi descartado e as células ressuspensas em 100 µL de GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L pH 8,0, Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0). Foram adicionados a esta suspensão bacteriana 200 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,2 mol/L), homogeneizado por inversão e mantido em gelo por 5 minutos. Após este período de tempo foram adicionados 200 µL de Kacf (acetato de potássio 0,88 mol/L e ácido fórmico 0,15 mol/L, pH 5,0). O lisado bacteriano foi homogeneizado por inversão várias vezes e mantido em gelo por 10 minutos, seguido pela adição de 50 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). As fases orgânica e aquosa foram misturadas por agitação vigorosa e a emulsão foi centrifugada a 15.000×g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e o ácido nucléico precipitado pela adição de 1,5 volume de etanol 96% (v/v) à temperatura ambiente. O precipitado foi coletado por centrifugação a 15.000×g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 80% (v/v) e centrifugado nas mesmas condições descritas. O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA seco a temperatura ambiente e dissolvido em 20-30 µL de água ultrapura.

Os plasmídeos destinados à reação de sequenciamento foram incubados com RNase a uma concentração final de 10 µg/mL por 3 horas a 37°C. Este DNA

foi desproteínezado com 20 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), centrifugado, precipitado com etanol 96% (v/v), lavado com etanol 80% (v/v), seco em temperatura ambiente e dissolvido em 15-20 µL de água.

3.5.2 Extração de DNA Cromossomal

O DNA de *H. seropedicae* foi purificado a partir de células crescidas em meio NFbHP suplementado com NH₄Cl 20 mmol/L até D.O.₅₅₀ = 1,0. Uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada por 1 minuto, ressuspensa em 400 µL de GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L pH 8,0 e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0) e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente com 50 µg/mL de lisozima. Após este período, foi acrescentado SDS a uma concentração final de 1% e 500 µg/mL de pronase E e incubado a 37°C durante aproximadamente 12 horas. O material foi extraído com 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 10 minutos. O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com 0,6 volume de isopropanol, lavado com etanol 80% (v/v) e seco à temperatura ambiente.

3.5.3 Purificação de DNA em Gel de Agarose de Baixo Ponto de Fusão

Fragmentos de DNA liberados na digestão de plasmídeos com endonucleases de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,8% (p/v). Após a corrida eletroforética o gel foi corado com uma solução de azul de metileno 0,25% (p/v) por 1 minuto e descorado com sucessivas lavagens com água ou corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. A banda de interesse foi cortada do gel e removida para tubo de microcentrífuga, sendo fundida a 65°C por 15 minutos. Foram adicionados 100 mmol/L de Tris-HCl, 250 mmol/L de NaCl e 1 mmol/L de EDTA pH 8,0, incubado a 65°C por 5 minutos,

seguido pela adição de 1 volume de fenol tamponado (pH 8,0). Esta mistura foi vigorosamente homogeneizada e centrifugada a 15.000×g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o DNA precipitado com 1 volume de isopropanol. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e o tubo centrifugado a 15.000×g por 15 minutos. O DNA sedimentado foi lavado com 500 µL de etanol 80% (v/v), novamente centrifugado, seco à temperatura ambiente e dissolvido em 10 µL de água ultrapura.

3.6 ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR

A separação e a estimativa do tamanho de fragmentos de DNA ou plasmídeos íntegros foi feita por eletroforese em gel de ágar 1% (p/v) em tampão TBE (Tris base 90 mmol/L; ácido bórico 90 mmol/L; EDTA 20 mmol/L pH 8,0). A corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão e na mesma concentração descrita acima. Para aplicação em gel as amostras de DNA foram misturadas a 0,2 volume de solução corante FSUDS (azul de bromofenol 0,08% (p/v); Ficoll 400 10% (p/v); SDS 1% (p/v); EDTA 1,8 mmol/L pH 8,0; Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0; xileno cyanol 0,4% (p/v)) e a corrida realizada a 5 V.cm⁻¹ de gel por 3 a 4 horas (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

O gel foi corado em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL por 20 minutos e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador (UVP, Inc. Upland, CA USA).

A massa molecular dos fragmentos de DNA foi estimada por comparação com o padrão eletroforético de fragmentos de DNA de tamanhos moleculares conhecidos (MBI Fermentas).

3.7 ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM

3.7.1 Digestão com Endonucleases de Restrição

As condições de digestão de DNA com endonucleases de restrição foram àquelas recomendadas pelo fabricante.

Em geral foram utilizados 0,1 – 1 µg de DNA, 1 – 2U de endonuclease de restrição em um sistema de volume 20-50 µL, mantido a 37°C por aproximadamente 3 horas.

O padrão de restrição foi determinado por eletroforese em gel de ágar 1% (p/v). Para aplicação em gel foi adicionado ao sistema de reação 3 – 5 µL de FSUDS. Para amostras destinadas a clonagem, 1/10 do volume do sistema de reação foi retirado e misturado com 3 µL de F.S.U.D.S para aplicação em gel.

Após a digestão, as enzimas foram termicamente inativadas de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol 96% (v/v), sedimentado por centrifugação a 15.000×g por 15 minutos, lavado com etanol 80% (v/v), seco à temperatura ambiente e dissolvido em água.

3.7.2 Ligação de DNA

Fragmentos de DNA com extremidades coesivas foram ligados a vetores linearizados com pontas coesivas compatíveis. Os sistemas de ligação foram feitos mantendo-se uma relação DNA inserto:vetor de 5:1 (concentração molar). As concentrações de inserto e vetor foram estimadas por eletroforese em gel de ágar 1% (p/v) de uma alíquota destes DNAs.

Os sistemas de ligação possuíam volume final de 20 µL, contendo 50 – 500 ng de vetor, T4 DNA Ligase 1 – 2U e tampão de ligação 1× concentrado (Tris-HCl,

MgCl₂, DTT e ATP). As concentrações dos componentes e o pH do tampão de ligação variaram de acordo com o fabricante.

O sistema de reação foi mantido a 15°C por aproximadamente 16 horas (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989). Uma alíquota de 1 – 2 µL deste sistema foi utilizado para transformação por eletroporação.

3.8 TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

3.8.1 Preparo de Células Competentes

Um pré-inóculo foi preparado inoculando-se uma colônia de *E. coli* (linhagem DH10B ou BL21(DE3)) em meio LB contendo o antibiótico apropriado e incubado a 37°C, sob agitação de 120 rpm por aproximadamente 16 horas. Um volume de 1 mL desta suspensão bacteriana foi transferido para 250 mL de meio SOB, cultivado nas mesmas condições descritas acima até a cultura atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,5 e 0,8. Neste ponto a cultura foi deixada em gelo durante 15 a 30 minutos. Esta cultura foi então centrifugada a 2.500×g durante 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante descartado.

As células sedimentadas foram delicadamente ressuspensas em 40 mL de água estéril a 4°C em banho de gelo e centrifugadas (2.500×g, 5 min., 4°C). O sobrenadante foi novamente descartado e as células novamente ressuspensas em 40 mL de glicerol 15% a 4°C e centrifugadas nas mesmas condições descritas acima. Após o descarte do sobrenadante as células foram ressuspensas e distribuídas em alíquotas de 20 µL e armazenadas a –70°C até serem usadas na transformação por eletroporação.

Para o preparo de células competentes de *H. seropedicae* foram transferidos 30 µL de cultura estocada em meio semi-sólido para 10 mL de meio NFbHP contendo NH₄Cl 20 mmol/L e antibióticos necessários, incubando-se durante 16 horas, a 30°C, sob agitação. Um volume de 2 mL da suspensão bacteriana foi

transferido para 40 mL de meio NFbPH contendo NH_4Cl 20 mmol/L, sem antibióticos, a 30°C até a cultura atingir D.O.₆₀₀ entre 0,8 e 1,0. Esta suspensão, manuseada em gelo durante todo o experimento, foi centrifugada a $4.300\times g$, 4°C por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com 15 mL de água ultrapura estéril a 4°C , seguida por lavagem com solução de glicerol 15% (v/v) e ressuspensa em 100 μL de solução de glicerol 15% (v/v) estéril, distribuídas em alíquotas de 20 μL e armazenadas a -70°C .

3.8.2 Eletroporação

Para eletroporação foram adicionados 20 – 30 ng de DNA a 20 μL de estoque de células competentes de *E. coli*, mantidas em gelo. A mistura foi colocada em cubeta de eletroporação resfriada em gelo e as células eletroporadas de acordo com as instruções do aparelho (Eletroporador Cell-Porator[®] Electroporation System – Life Technologies, Gaithersburg, EUA), ajustado nas seguintes condições: resistência de 200 Ω ; capacitância de 300 μF e voltagem 4 kV. Nestas condições um pulso foi aplicado. Imediatamente após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC e incubadas a 37°C , durante 1 hora. Foram plaqueadas 100 μL da suspensão em meio LA seletivo e incubadas a 37°C durante 12 a 16 horas.

A eletroporação de *H. seropedicae* foi realizada ajustando-se o aparelho para capacitância de 300 μF e voltagem 4 kV. Após o pulso as células foram ressuspensas em 1 mL de meio NFbHP contendo NH_4Cl 20 mmol/L e incubadas a 30°C durante 3 horas. Após este tempo foram plaqueadas 300 μL das células em meio NFbHP sólido contendo NH_4Cl 20 mmol/L com antibióticos apropriados e incubado a 30°C durante 24 horas.

3.9 SEQUENCIAMENTO DE DNA

3.9.1 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento de DNA foi baseada no processo de incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes. Para esta reação foi utilizado cerca de 100 a 400 ng de DNA purificado, 10 pmols do iniciador apropriado e 4,0 μL de mistura para sequenciamento DYEnamic ET (Amersham Biosciences), completando um sistema de volume final de 10 μL . A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems), com os seguintes ciclos de temperatura: 95°C/20 s (1 ciclo); 96°C/20s, 60°C/1,30 min (30 ciclos).

Foram adicionados 10 μL de água ultrapura ao produto da reação de sequenciamento, que foi precipitado com 20 μL de isopropanol, centrifugado a 15.000 \times g por 20 minutos, lavado com etanol 80% (v/v), seco à temperatura ambiente e dissolvido em 4 μL de tampão de aplicação (formamida:EDTA 25 mM pH 8,0 + blue dextran 50 mg/mL (5:1)) (Applied Biosystems), mantido a 90°C por 2 minutos e colocado em gelo. Após este tratamento a amostra foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 5% em Sequenciador Automático de DNA ABI-PRISM 377 (Perkin-Elmer).

3.9.2 Edição e Análise de Sequências

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

O alinhamento de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foi feito pelo programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Este alinhamento foi usado para gerar uma representação gráfica da conservação dos aminoácidos pelo programa

WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (CROOKS et al., 2004). Esta representação é calculada com base na frequência de cada aminoácido em cada posição.

As seqüências de aminoácidos das proteínas ModE1 e ModE2 de *H. seropedicae* foram analisadas pelo programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de>) (SCHULTZ et al., 1998; LETUNIC et al., 2006) para identificação de domínios. Este programa também foi utilizado para a identificação de seqüência sinal nas proteínas ModA1 e ModA2. Para a determinação de hélices transmembrana nas proteínas ModB1 e ModB2 foi utilizado o programa SOSUI (HIROKAWA, BOON-CHIENG e MITAKU, 1998).

3.10 MUTAGENESE

3.10.1 Mutagênese

A inativação dos genes *fdxA* e *modB2* foram obtidas inserindo-se no mesmo sentido de transcrição, o cassete *lacZ-Km* do plasmídeo pKOK6.1 no sítio de restrição *NsiI* de *fdxA* e de *modB2* (KOKOTEK e LOTZ, 1989).

Para obtenção do cassete, o plasmídeo pKOK6.1 foi digerido com a endonuclease de restrição *PstI*. O cassete *lacZ-Km* foi separado e purificado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) de baixo ponto de fusão (item 3.5.3).

O plasmídeo HS25-MF-013-D09 (*orf1(5')-modA1(5')*) contendo o gene *fdxA* inteiro foi selecionado do banco de genes do *H. seropedicae*. Este plasmídeo foi submetido à restrição com a enzima *EcoRI*. O fragmento liberado de aproximadamente 1280 pb foi purificado em gel de agarose de baixo ponto de fusão (item 3.5.3) e clonado no sítio *EcoRI* do plasmídeo pSUP202 dando origem ao plasmídeo pALFSA (Figura 6A).

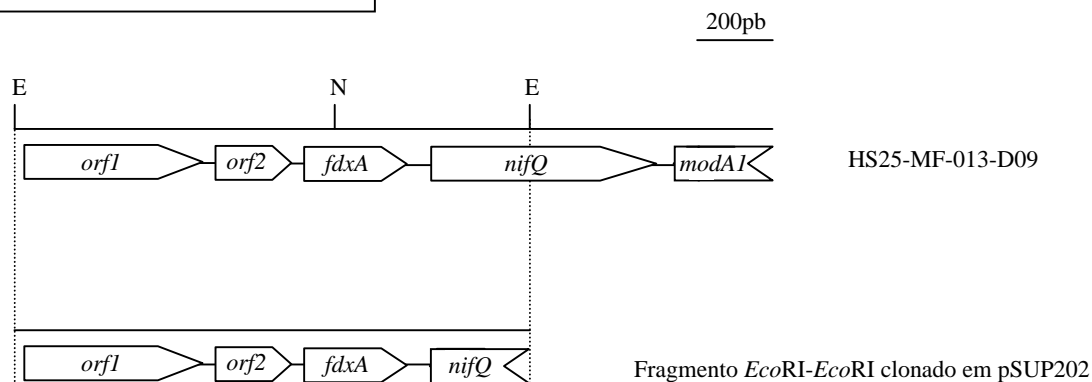
O plasmídeo pALFSA foi utilizado para inserir um cassete *lacZ::Km* (liberado do plasmídeo pKOK6.1 digerido com *Pst*I) no sítio *Nsi*I presente no gene *fdxA* na mesma orientação do gene, originando o plasmídeo pALFKC (Figura 6A).

O plasmídeo HS05-EG-048-B06 (*modA2-modB2(5')*) contendo parte do gene *modB2* foi digerido com *Eco*RI e *Pst*I e o fragmento liberado clonado em pSUP202 dando origem ao plasmídeo pALFAB (Figura 6B). Este plasmídeo foi utilizado para inserir o cassete *lacZ-Km* no sítio *Nsi*I presente no gene *modB2*, na mesma orientação do gene, dando origem ao plasmídeo pABKC (Figura 6B)

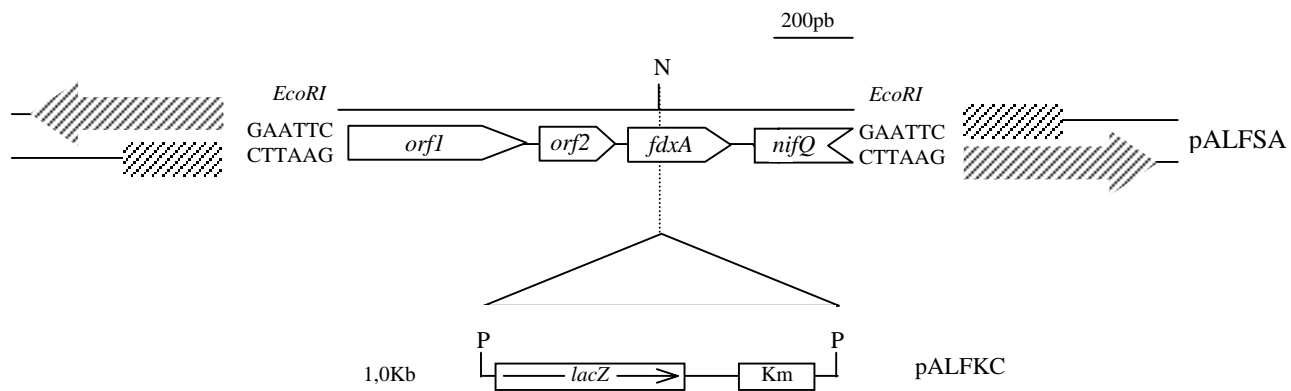
FIGURA 6 ESQUEMA DE MUTAGÊNESE DOS GENES *fdxA* E *modB2* DE *H. seropedicae*

A

1 Clonagem de *fdxA* em pSUP202



2 Inserção do cassette *lacZ-Km* no gene *fdxA*

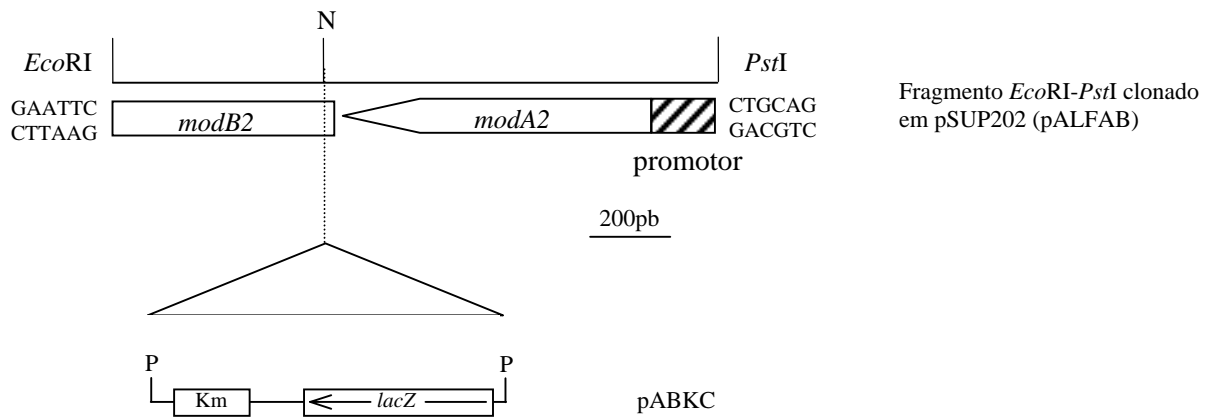


Os sítios de restrição estão indicados na figura. E, *EcoRI*; N, *NsiI*; P, *PstI*. As setas indicam os sentidos de transcrição dos genes.

FIGURA 6 ESQUEMA DE MUTAGÊNESE DOS GENES *fdxA* E *modB2* DE *H. seropedicae* - Continuação

B

1 Clonagem de *modB2* em pSUP202 e inserção do cassete *lacZ*-Km



Os sítios de restrição estão indicados na figura. N, *NsiI*; P, *PstI*. As setas indicam os sentidos de transcrição dos genes.

3.10.2 Mutagênese de *H. seropedicae*

Estirpes mutantes de *H. seropedicae* foram obtidas introduzindo-se os plasmídeos construídos *in vitro* com inserção sítio dirigida de cassete *lacZ*-Km nos genes estudados (pALFKC e pABKC) na estirpe selvagem de *H. seropedicae* (SMR1).

As construções foram introduzidas por eletroporação como descrito (item 3.8). As colônias de *H. seropedicae* crescidas foram testadas quanto à resistência ao antibiótico do cassete inserido e sensibilidade ao antibiótico de resistência do vetor no qual o gene estava clonado.

As possíveis estirpes mutantes selecionadas foram inoculadas em 3 mL de meio NFbHP contendo NH₄Cl 20 mmol/L com os antibióticos apropriados. Desta cultura, 1,5 mL foi transferido para tubo de microcentrífuga e o DNA cromossomal foi extraído como descrito no item 3.5.2.

3.10.3 Hibridização de DNA (*Southern Blot*)

A técnica de hibridização de DNA permite detectar fragmentos específicos de DNA em amostras de composição complexa como DNAs genômicos (SOUTHERN, 1975). Esta técnica foi utilizada para verificar a inserção do cassete *lacZ*-Km nos genes alvo de estudo no genoma da bactéria *H. seropedicae*.

3.10.3.1 Digestão do DNA cromossomal e separação em gel de agarose

O DNA cromossomal das estirpes de *H. seropedicae* estirpe selvagem (SMR1) e estirpes mutantes foram digeridos com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *PstI*. Os fragmentos de DNA gerados pela digestão foram separados em gel de agarose 0,8% (p/v). O gel foi corado em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL por 20 minutos e visualizado em transiluminador com descrito (item 3.6).

3.10.3.2 Transferência e fixação do DNA à membrana de náilon

Após a eletroforese o gel foi transferido para o sistema de transferência por pressão negativa usando o sistema Vaccum Blot (Pharmacia Biotech), sendo posicionado sobre uma membrana de náilon HybondTM N de mesma dimensão do gel. Este sistema foi acoplado a uma bomba a vácuo e após a aplicação de uma pressão de 50 mbar, o gel foi regado constantemente com uma solução de depurinação (HCl 250 mmol/L) por 5 minutos. O gel foi então rapidamente lavado com água destilada seguido pela aplicação de uma solução de desnaturação (NaCl 1,5 mol/L; NaOH 0,5 mol/L) por 10 minutos. O gel foi novamente lavado com água destilada e aplicada uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 mol/L pH 7,5; NaCl 1,5 mol/L) por 10 minutos e solução de transferência (NaCl 3,0 mol/L; citrato trissódico dihidratado 0,3 mol/L, pH 7,0) por aproximadamente 1 hora.

A membrana foi seca a temperatura ambiente e o DNA foi fixado à membrana através da exposição à luz ultravioleta (312 nm) durante 4 minutos. Esta membrana foi armazenada em garrafa de hibridização até a sua utilização.

3.10.3.3 Preparo da sonda de DNA marcada com [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP

A marcação do DNA utilizado como sonda foi realizada como descrita (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989). O plasmídeo HS05-MF-037-A04 digerido com a enzima *EcoRI* foi marcado com [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP com auxílio do fragmento Klenow da DNA polimerase I. O sistema utilizado para marcação da sonda está descrito na Tabela 5.

TABELA 5 SISTEMA DE MARCAÇÃO RADIOATIVA DE DNA UTILIZADO COMO SONDA PARA HIBRIDIZAÇÃO DE DNA

COMPONENTE	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO FINAL
DNA desnaturado	40 ng	800 ng/mL
OLB*	12 µL	-
BSA 10 mg/mL	2,5 µL	500 µg/mL
[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (10 µCi/µL)	2,0 µL (20 µCi)	133,2 nmol/L
Klenow	2,5 U	50 U/mL
H ₂ O	q.s.p 50 µL	

* OLB = mistura A:B:C (1:2,5:1,5)

solução A: Tris-HCl (pH 8,0) 1,25 mmol/L, MgCl₂ 0,125 mmol/L, β -mercaptoetanol 5 mmol/L, 2 mmol/L de dATP, dGTP e dTTP

solução B: Mops 2 mol/L

solução C: hexadesoxinucleotídeos 1 mg/mL

Este sistema foi incubado a temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas. Para a hibridização a sonda marcada foi aquecida a 100°C por 5 minutos, resfriada em gelo e adicionada a solução de pré-hibridização.

3.10.3.4 Pré-hibridização e hibridização

Na garrafa de hibridização contendo a membrana com o DNA fixado, a pré-hibridização foi realizada em 20 mL de tampão Tris-HCl 100 mmol/L pH 8,0; SDS 7% (p/v) e EDTA 1 mmol/L, a 65°C por 30 minutos. Para bloquear ligações inespecíficas da sonda à superfície da membrana, foi adicionado à solução de pré-hibridização 4 µL de DNA de esperma de salmão (2 mg/mL) previamente fervido por 5 minutos, incubando-se a 65°C por 4 horas..

Para a hibridização a sonda marcada com [^{32}P] foi adicionada à solução de pré-hibridização e incubada a 65°C durante aproximadamente 24 horas sob constante agitação rotatória em forno de hibridização (Hybaid).

Após a hibridização, a membrana foi lavada duas vezes com 20 mL de solução de alta estrigência (SSC 0,1×, SDS 0,1% (p/v)) a 65°C por 30 minutos, seca e visualizada com PhosphorImager Storm (GE Healthcare).

3.11 EXPERIMENTOS DE FISILOGIA

Para determinação da função dos genes estudados e identificação de prováveis regiões promotoras, foram realizados ensaios de atividade da nitrogenase, inativação reversível da nitrogenase por amônio e ensaios de β -galactosidase.

3.11.1 Ensaio de Atividade da Nitrogenase em Meio Semi-Sólido

A atividade da nitrogenase foi determinada em culturas mantidas em 4 mL de meio NFbHP semi-sólido contendo 0,5 mmol/L de glutamato de sódio, após 24 horas de incubação a 30°C ou após formação de película na superfície do meio. Os frascos foram fechados com rolha de borracha, acetileno injetado (10% de fase gasosa) e incubados a 30°C por 1 hora. Para determinar as quantidades de etileno produzidas foram tomadas alíquotas de 0,5 mL da fase gasosa e analisadas em cromatografia gasosa (Cromatógrafo Varian, modelo 3400, equipado com coluna Porapak N e detector de ionização de chama) (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967). Foi usado nitrogênio como gás de arraste a um fluxo de 20 mL/min, temperatura da coluna de 120°C, do detector de 200°C e como padrão etileno.

O cálculo do etileno formado foi realizado utilizando etileno padrão, no qual 0,5 mL contém 2,23 nmoles de etileno a 1 atm e a 25°C e a atividade específica da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto e por mg de proteína total da cultura.

3.11.2 Ensaio de Desrepressão e Inativação Reversível da Nitrogenase por Amônio (Switch off/on)

Para ensaios de desrepressão e inativação reversível da nitrogenase *H. seropedicae* estirpes selvagem SMR1 e mutante KC6 foram cultivadas em frascos de 60 mL contendo 10 mL de meio NFbHP suplementado com glutamato de sódio 4 mmol/L durante 16 horas, sob agitação de 120 rpm à 30°C em agitador rotatório de água. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e acetileno foi injetado (10% da fase gasosa), mantendo-os à 30°C sob agitação e a formação de etileno foi analisada em intervalos de tempo de 10 minutos, com a adição de NH₄Cl 350 µmol/L ou 1 mmol/L aos 30 minutos. As quantidades de etileno formadas foram determinadas de acordo com o ítem 3.11.1.

3.11.3 Ensaio de Atividade de β-galactosidase

A atividade de β-galactosidase em culturas de *H. seropedicae* foi determinada como descrito por MILLER (1992) com modificações. Alíquotas de 100 µL de cultura foram misturadas a 900 µL de tampão Z (Na₂HPO₄.7H₂O 60 mmol/L, NaH₂PO₄.H₂O 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO₄.7H₂O 1 mmol/L, β-mercaptoetanol 50 mmol/L, SDS 0,0027%; pH 7,0), seguido pela adição de 2 gotas de clorofórmio. O sistema foi agitado vigorosamente e incubado em banho de água a 30°C por 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) (4 mg/mL em tampão Z) e interrompida pela adição de 500 µL de Na₂CO₃ 1mol/L após mudança da coloração do sistema. A absorbância do produto colorido foi determinada em 420 nm e 550 nm. A reação controle foi feita seguindo o mesmo procedimento, porém com água como amostra.

A atividade de β-galactosidase foi determinada como quantidade (nmol) de orto-nitrofenol (ONP) formado por mg de proteína por unidade de tempo (min).

3.12 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES *modE1* E *modE2*

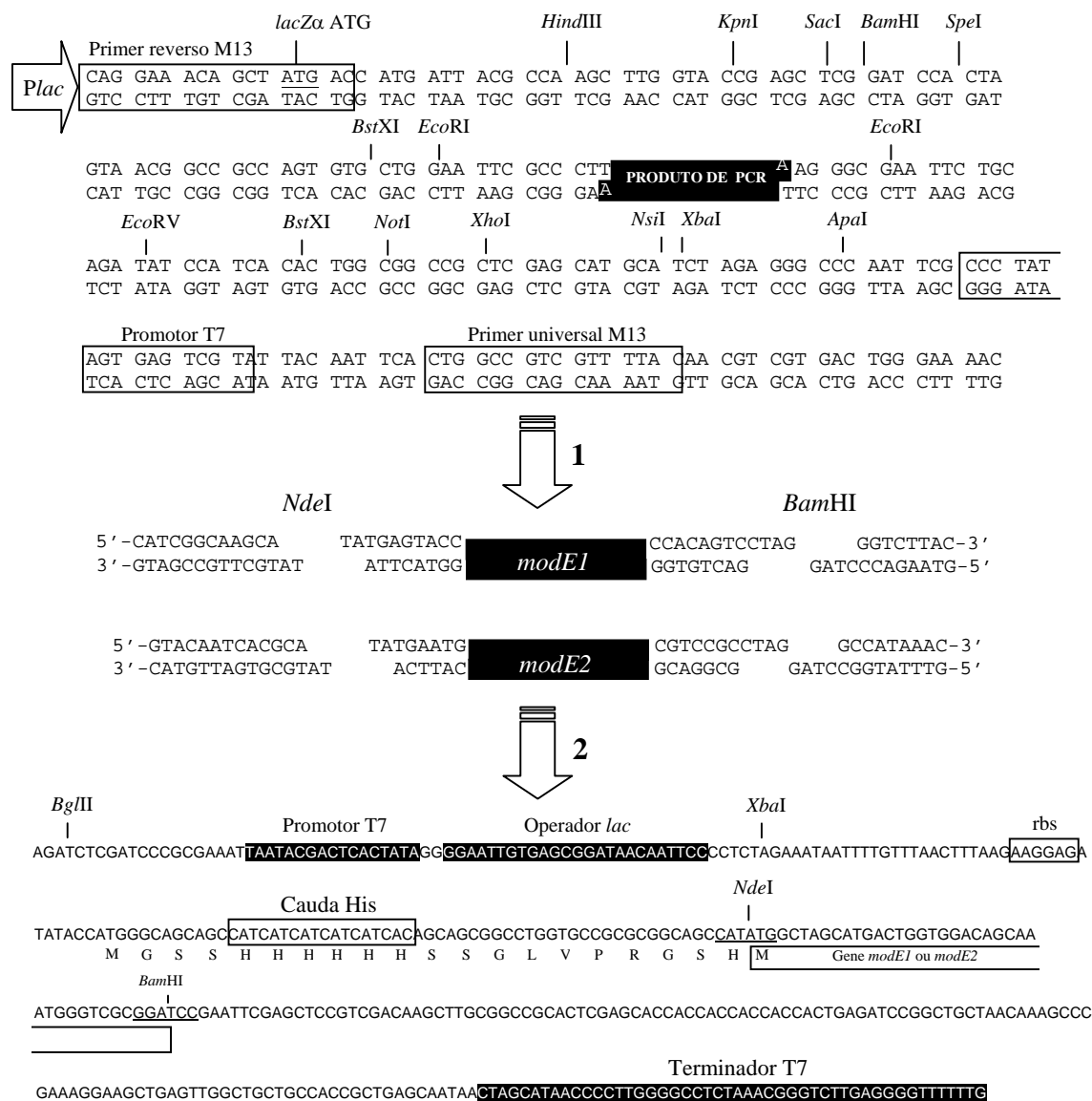
Os genes *modE1* e *modE2* de *H. seropedicae* foram amplificados por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando como molde o DNA genômico de *H. seropedicae* SMR1. Nesta reação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos *NdeI*-*modE1*R (5'CATCGGCAAGCATATGAGTACC3'), *Bam*HI-*modE1*F (5'GGTGTCAGGATCCCAGAATG3') e *NdeI*-*modE2*R (5'GTACAATCACGCATATGAATG3'), *Bam*HI-*modE2*F (5'GCAGGCGGATCCGGTATTTG3'), respectivamente. Os iniciadores utilizados contêm os sítios de restrição *NdeI* e *Bam*HI (sublinhados) para clonagem em vetor de expressão.

A mistura de reação para amplificação continha aproximadamente 20 ng do DNA molde, 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 0,2 mmol/L de dNTP (mistura equimolar de desoxirribonucleotídeos), 1,5 mmol/L de MgCl₂ e Taq DNA polimerase (1U), tampão Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,6, KCl 100 mmol/L, e volume final de 25 µL. Para esta reação foi utilizado um termociclador (Perkin-Elmer) com os seguintes ciclos de temperatura: 94°C/5 min. (1 ciclo); 94°C/30 s, 52,5 °C/30 s, 72 °C/1,5 min. (35 ciclos) e 72°C/5 min.

Os produtos de PCR *modE1* (874 pb) e *modE2* (415 pb) foram clonados em vetor pCR[®]2.1 do kit TA Cloning[®] (Invitrogen[™]) dando origem aos plasmídeos pCR2.1*modE1* e pCR2.1*modE2*, respectivamente (Figura 7).

O sistema de clonagem TA liga o produto de PCR no plasmídeo pCR[®]2.1 de 3,9 kb. O vetor foi construído para ser um vetor linear contendo uma deoxitimidina (T) na extremidade 3' que é ligada a uma deoxiadenina (A) na extremidade 3' do produto de PCR (Invitrogen[™]). Os plasmídeos pCR2.1*modE1* e pCR2.1*modE2* foram digeridos com *NdeI* e *Bam*HI. Os fragmentos liberados pela digestão, correspondendo aos genes *modE1* e *modE2* foram purificados em gel de agarose 1% (p/v) usando o kit QIAquick gel extraction (Qiagen). Estes fragmentos purificados foram inseridos no vetor de expressão pET-28a(+) previamente digerido

com *NdeI* e *BamHI*, resultando nos plasmídeos pET28amodE1 e pET28amodE2. Em todas as etapas de clonagem os plasmídeos foram analisados por sequenciamento em seqüenciador ABI PRISM™ 377.

FIGURA 7 - ESQUEMA DE CLONAGEM DOS GENES *modE1* E *modE2*

3.13 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ModE1 E ModE2 EM PEQUENA ESCALA

Os plasmídeos pET28amodE1 e pET28amodE2 que contêm os genes *modE1* e *modE2* de *H. seropedicae* inseridos no vetor de expressão pET-28a(+), respectivamente, foram introduzidos por eletroporação em *E. coli* estirpe BL21(DE3) para induzir a expressão das proteínas ModE1 e ModE2 contendo uma cauda de histidinas N-terminal. Algumas colônias transformantes foram inoculadas em 10 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e incubadas sob agitação de 200 rpm a 20°C, 30°C ou 37°C até a cultura atingir uma absorbância de aproximadamente 0,3 em comprimento de onda de 600 nm. Nesta etapa a expressão das proteínas His-ModE1 e His-ModE2 foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mmol/L ou lactose 15 mmol/L (0,5% (p/v)), mantendo-se as culturas em agitação constante na temperatura testada por mais 3 horas. Nesta etapa as células foram sedimentadas por centrifugação a 15.000×g em tubos de microcentrífuga, a massa celular foi ressuspensa em diferentes tampões de lise e as células rompidas por sonicação (3x30 segundos, com intervalos de 1 minuto) em Ultrasonic processor XL (Heat Systems). Para otimizar as condições de expressão da maior quantidade de proteína solúvel, foram testados diferentes indutores, cultivo em diferentes temperaturas e tampões de lise com diferentes pHs, contendo diferentes sais (NaCl, KCl e MgCl₂) nas concentrações de 10-500 mmol/L. Com base nos experimentos realizados, a indução da expressão das proteínas ModE1 e ModE2 em grande escala foi feita em 250mL de cultura crescida a 37°C sob agitação de 200 rpm. Assim que a cultura atingiu A₆₀₀ em torno de 0,3 foi adicionado IPTG 0,5 mmol/L mantendo a cultura nas mesmas condições por mais 3 horas.

3.14 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ModE1 E ModE2

3.14.1 Eletroforese de Proteína sob Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

As análises eletroforéticas de proteínas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante foram feitas como descrito por LAEMMLI (1970). Esta técnica é utilizada para separar proteínas de acordo com sua massa. A solução de proteína a ser analisada é misturada com SDS, um detergente aniônico que desnatura as proteínas ligando-se ao esqueleto polipeptídico, conferindo uma carga negativa ao polipeptídeo proporcional ao seu tamanho. Além da adição de SDS, a solução de proteína é fervida na presença de agente redutor como β -mercaptoetanol.

O sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida é composto pelos géis de empilhamento e separador. O gel de empilhamento possui pH 6,8 e concentração de poliacrilamida de 4% e o gel separador possui pH 8,8 e concentração de poliacrilamida de 15%.

Antes de serem analisadas por SDS-PAGE as amostras foram misturadas com 5,0 μ L de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mmol/L pH 6,8, glicerol 8,7% (v/v), SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,00125% (p/v)) e aquecidas a 100°C por 3 minutos. As eletroforeses foram realizadas a 150-200 V em tampão Laemmli (Tris base 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L; pH 8,3 e SDS 0,1% (p/v)) durante aproximadamente 60 minutos. Os géis foram corados com solução de azul de Coomassie G-250 0,1% (p/v) e descorados com solução descorante para gel de proteína (metanol 25% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)).

3.14.2 Purificação da Proteína His-ModE1

E. coli estirpe BL21(DE3) contendo a construção pET28amodE1 teve a expressão da proteína His-ModE1 induzida como descrito no item 3.13. Esta proteína formou agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. O procedimento adotado para rompimento das células por sonicação, separação dos corpos de inclusão do extrato solúvel, solubilização e redobramento de His-ModE1 sem a formação de agregados de proteína estão resumidos na Figura 8.

FIGURA 8 - ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE1 DE *H. seropedicae*

Rompimento das Células e Preparação dos Corpos de Inclusão

E. coli BL21(DE3)+pET28amodE1 (250 mL)
Células ressuspensas em 20 mL de tampão de lise/30 min em gelo
Sonicação - 3×30 segundos



Lisado
Centrifugação/12.000×g – 20 minutos



Precipitado⁽¹⁾ = corpos de inclusão (His-ModE1)
Sobrenadante = S/N1



Isolamento e Lavagem dos Corpos de Inclusão

Precipitado⁽¹⁾



20 mL tampão de lavagem/4°C – 1 h
Sonicação - 3×30 segundos
Centrifugação 12.000×g – 20 minutos } 2×

Solubilização

Precipitado⁽²⁾ = corpos de inclusão (His-ModE1)
Sobrenadantes = S/N2 e S/N3



20 mL tampão de solubilização/4°C – 1 h
Sonicação - 3×30 segundos
Centrifugação 12.000×g – 20 minutos

S/N4 -sobrenadante (His-ModE1 solubilizada)
Precipitado – proteína insolúvel (descartado)



Renaturação na Coluna e Cromatografia de Afinidade

Gradiente 100 – 0% de uréia



Lavagem
Eluição
Diálise das frações reunidas

His-ModE1 purificada

3.14.3 Rompimento das Células e Preparação dos Corpos de Inclusão

Uma cultura de 250 mL de *E. coli* BL21(DE3) contendo a construção pET28amodE1 super-expressou a proteína His-ModE1 induzida por IPTG 0,5 mmol/L (item 3.13). Esta cultura foi centrifugada a 12.000×g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 20 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, NaCl 500 mmol/L, PMSF 1 mmol/L, glicerol 10% (v/v) e lisozima 200 µg/mL) e incubado em gelo por 30 minutos. A suspensão celular foi sonicada em gelo (3×30 segundos com intervalos de 1 minuto) e centrifugada a 12.000×g por 20 minutos. A fração sobrenadante (S/N1) foi guardada em gelo e o precipitado⁽¹⁾ (Figura 8) foi ressuspensão em 20 mL de tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, NaCl 500 mmol/L, uréia 2 mol/L, Triton X-100 0,5% (p/v), DTT 1 mmol/L) e mantido a 4°C por 1 hora. Esta suspensão foi novamente sonicada (3×30 segundos com intervalos de 1 minuto), centrifugada a 12.000×g por 20 minutos, sendo o sobrenadante (S/N2) guardado em gelo e o precipitado tratado novamente com o mesmo procedimento. Este novo sobrenadante (S/N3) foi guardado em gelo e o precipitado⁽²⁾ (Figura 8) submetido ao tratamento para solubilização e redobramento das proteínas agregadas.

3.14.4 Solubilização, Redobramento e Cromatografia de Afinidade de His-ModE1

Para solubilizar as proteínas dos corpos de inclusão, o precipitado⁽²⁾ (Figura 8) foi ressuspensão em 20 mL de tampão de solubilização (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, NaCl 500 mmol/L, uréia 8 mol/L, DTT 1,0 mmol/L) e mantido a 4°C por 1 hora. Esta suspensão foi novamente sonicada e centrifugada a 12.000×g por 15 minutos a 4°C.

A fração sobrenadante (S/N4) contendo a proteína His-ModE solubilizada foi aplicada a coluna HiTrap Chelating HP (5 mL) carregada com Ni²⁺. A cauda de

histidinas de His-ModE1 é capaz de quelar os íons Ni^{2+} da coluna, imobilizando a proteína. O redobramento de His-ModE1 foi realizado com a proteína ligada na matriz da coluna em tampão de renaturação (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, NaCl 500 mmol/L) através de um gradiente linear decrescente de uréia (8 mol/L-0). Após esta etapa a proteína foi eluída da coluna com um gradiente linear crescente de imidazol (0-1,0 mol/L). Foram coletadas 25 frações de 2 mL e analisadas em SDS-PAGE.

As frações que possuíam concentrações maiores de His-ModE1 foram reunidas e dialisadas contra o tampão de armazenamento (Tris-HCl 50 mmol/L, glicerol 50% (v/v) e NaCl 500 mmol/L) a 4°C por 16 horas e a proteína purificada foi armazenada a -80°C.

3.14.5 Purificação da Proteína His-ModE2

Uma cultura de 250 mL de *E. coli* BL21(DE3) contendo a construção pET28amodE2 super-expressou a proteína ModE2 induzida por IPTG 0,5 mmol/L (item 3.13). Esta cultura foi centrifugada a 12.000×g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 20 mL de tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, glicerol 10% (p/v), NaCl 500 mmol/L). Esta suspensão foi sonicada em gelo (3×30 segundos com intervalos de 1 minuto) e centrifugada a 12.000×g por 20 minutos. A fração sobrenadante foi aplicada à coluna HiTrap Chelating HP (5 mL) carregada com Ni^{2+} . Os tampões utilizados para eluição da proteína His-ModE2 foram os mesmos utilizados para a purificação de His-ModE1, como descritos acima. Foram coletadas 25 frações de 2 mL e analisadas por SDS-PAGE. Aquelas que possuíam concentrações maiores de proteína foram reunidas e adicionado glicerol a uma concentração final de 50% (v/v). A proteína purificada foi quantificada e armazenada a -80°C.

3.14.6 Dosagem de Proteína

Proteínas totais foram determinadas pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.15 ENSAIO DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 A DNA

Os ensaios de ligação das proteínas His-ModE1 e His-ModE2 a DNA utilizaram um fragmento *Bam*HI-*Nhe*I de aproximadamente 350 pb contendo a região promotora do gene *modA2*. Nesta região foi encontrada uma sequência consenso para ligação da proteína ModE, regulador transcricional dos genes *modABC*, responsáveis pelo transporte de molibdênio em *E. coli* (ANDERSON et al., 1997). As reações de ligação foram realizadas em um sistema de volume final de 10 μ L contendo 5 nmol/L de DNA marcado com [α^{32}]dCTP, tampão (Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, KCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, MgCl₂ 7 mmol/L e glicerol 10% (p/v)), diferentes concentrações das proteínas His-ModE1 ou His-ModE2 (0-800 nmol/L) e NaMoO₄.2H₂O 10 mmol/L quando requerido. Este sistema foi incubado a 30°C por 10 minutos e aplicado em gel de poliacrilamida 4% (v/v) (acrilamida:bis-acrilamida (19:1)) em TBE 1 \times . A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1 \times a 60V, durante aproximadamente 1,5 hora a 4°C. Os géis foram secos em secador de gel Heto dry GD-1 (Heto Lab Equipment, Allerod, Denmark) e visualizados em PhosphorImager StormTM (GE Healthcare).

3.15.1 Marcação Radioisotópica da Região Promotora do Gene *modA2*

O fragmento de DNA de aproximadamente 350 pb contendo a região promotora de *modA2* de *H. seropedicae* foi obtido através da digestão do plasmídeo HS05-EG-048-B06 com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Nhe*I. O fragmento

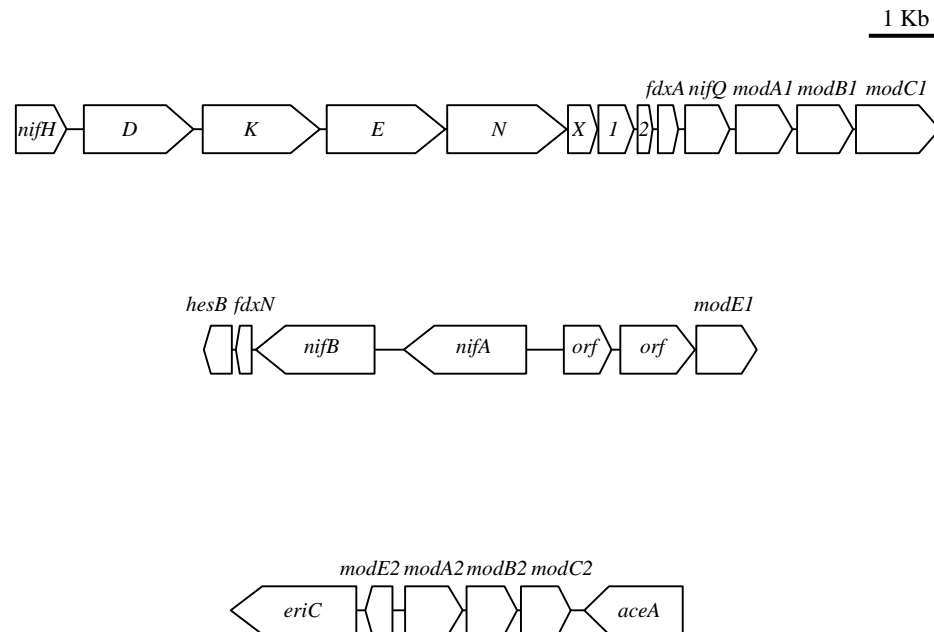
purificado foi marcado com [^{32}P]. O sistema de marcação continha cerca de 100 nmol/L de DNA, tampão de reação (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, MgCl_2 5 mmol/L e DTT 1 mmol/L), 0,2 mmol/L de dTTP, dATP, dGTP e 1,0 μL de α [^{32}P] dCTP (10 $\mu\text{Ci/mL}$) e 5,0 U de enzima Klenow em um volume final de reação de 100 μL . A reação foi incubada a 30°C por 30 minutos e purificada utilizando kit PCR clean-up (Qiagen) para remoção de nucleotídeos não incorporados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nif* DE *H. seropedicae*

Os genes estruturais da nitrogenase de *H. seropedicae* estão localizados em uma região do genoma de aproximadamente 36 kb contendo genes *nif* responsáveis pela regulação da fixação de nitrogênio, biossíntese do cofator FeMo e maturação dos componentes estruturais em formas ativas. Nesta região também estão presentes alguns genes *nif*-associados como genes de ferredoxinas, de regulação e transporte de molibdato e *orfs* conservadas entre alguns diazotrofos e *orfs* de função desconhecida. Na região a jusante dos genes *nifHDKENXorf1orf2* estão localizados os genes *fdxA**nifQ* e os genes *modA1B1C1* (Figura 9), organização incomum entre os diazotrofos estudados (MACHADO et al., 1996; KLASSEN et al., 1999; SOUZA, 2003). A montante do gene *nifA* está presente o gene *modE1* (VOIGT, 2000) que codifica um regulador transcricional dos genes *mod*. Em uma região distinta do genoma de *H. seropedicae* está localizado um segundo grupo de genes *mod* (*modA2B2C2*) entre os genes *eriC* (canal de cloreto) e *aceA* (isocitrato liase) (www.genopar.org) (Figura 9).

FIGURA 9 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES *mod* E *fdxA* EM *H. seropedicae*



FONTE: SOUZA et al., 1991a; MACHADO et al., 1996; KLASSEN, et al., 1999; VOIGT, 2000; SOUZA, 2003 e www.genopar.org

A figura não está mostrando toda a região *nif* de *H. seropedicae*. Estão representados somente os genes estudados neste trabalho e o contexto genômico no qual estão inseridos. Os genes estão indicados na figura e as setas indicam o sentido de transcrição.

4.2 ANÁLISE DO GENE *fdxA* DE *H. seropedicae*

Na região dos genes *nif* de *H. seropedicae* foram encontrados quatro genes que codificam ferredoxinas, duas do tipo 2Fe-2S (*fdx1* e *fdx2*) e duas do tipo 2[4Fe-4S] (*fdxA* e *fdxN*). O gene *fdxA* (EF666057) está localizado a jusante dos genes *nifHDKENXorf1orf2* e imediatamente a montante dos genes *nifQmodA1B1C1* (SOUZA, 2003) e o gene *fdxN* (M60319) está localizado a jusante do gene *nifB* e a montante de *hesB* (REGO et al., 2006) (Figura 9).

O gene *fdxA* codifica uma proteína de 101 aminoácidos e possui dois grupos de cisteínas conservados, formando dois motivos (Cys-X₂-Cys-X₂-Cys-X₃-Cys) separados por 41 aminoácidos, que provavelmente coordenam dois grupos [4Fe-4S] (BRUSCHI e GUERLESQUIN, 1988) (Figura 10).

Análise da seqüência de aminoácidos de *fdxA* indicou 64% de identidade (81% de similaridade) a uma ferredoxina 4Fe-4S de *Burkholderia vietnamiensis G4* (ABO58950) (MENARD et al., 2007), 56% de identidade (72% de similaridade) a proteína FdxA from *Azospirillum brasilense* (AAK51501) (POTRICH et al., 2001), 55% de identidade (73% de similaridade) a proteína Fer3 de *Bradyrhizobium japonicum* (AAG60736) (GOTTFERT et al., 2001) e 50% de identidade (75% de similaridade) a ferredoxina FdIII de *Rhodobacter capsulatus* (M26323) (MORENO-VIVIAN et al., 1989). Nestes organismos, os genes que codificam estas ferredoxinas estão localizados no grupo de genes *nifENX* (KLASSEN et al., 1999; MENARD et al., 2007; POTRICH et al., 2001; GOTTFERT et al., 2001; MORENO-VIVIAN et al., 1989).

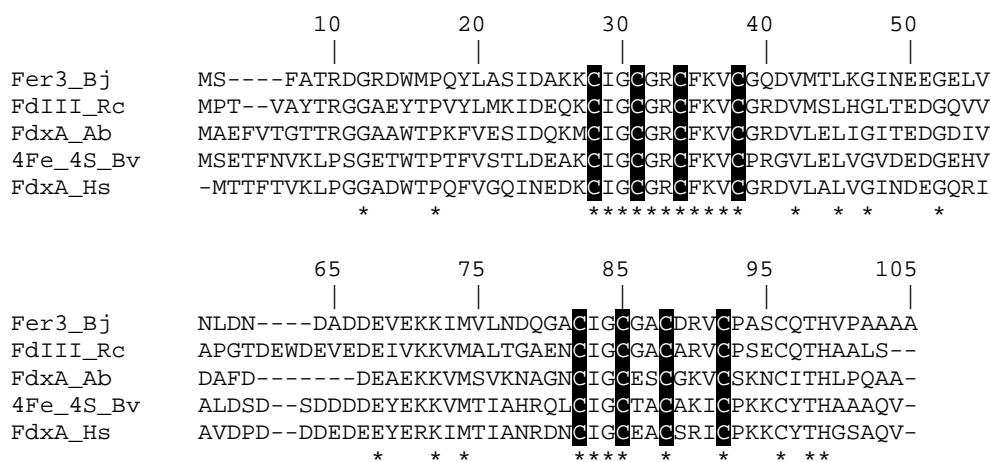
O gene *fdxN* codifica uma ferredoxina de 72 aminoácidos contendo dois grupos de cisteínas conservadas, o primeiro apresentando um padrão típico Cys-X₂-Cys-X₂-Cys-X₃-Cys e o segundo apresentando um padrão incomum Cys-X₂-Cys-X₈-Cys-X₃-Cys. A comparação entre as ferredoxinas FdxA e FdxN de *H. seropedicae* não mostrou similaridade significativa em suas seqüências de aminoácidos, com exceção dos grupos de cisteínas conservadas.

A localização dos genes *fdxA* e *fdxN* em operons de genes essenciais para a síntese da nitrogenase sugere o envolvimento do produto destes genes na transferência de elétrons no processo de fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*.

Na região dos genes *nif* de *H. seropedicae*, dois outros genes que codificam ferredoxinas do tipo [2Fe-2S] (*fdx1* e *fdx2*) foram anotados no sequenciamento genômico. O gene *fdx1* está localizado a 3,5 kb a jusante do gene *nifH*, enquanto *fdx2* está a 17,5 kb a montante de *nifH* (www.genopar.org). Estes genes codificam ferredoxinas de 100 e 111 aminoácidos, respectivamente. Ambas proteínas apresentam resíduos de cisteínas conservados, formando um motivo (Cys-X₅-Cys-X₂-Cys-X₃₅-Cys) típico para coordenação do grupo [2Fe-2S] (Figura 11).

O gene *fdx1* foi mutagenizado e não apresentou fenótipo de deficiência na redução de acetileno em condições de presença e ausência de fonte de nitrogênio, indicando o não envolvimento do produto deste gene no processo de fixação biológica de nitrogênio (SOUZA, 2003).

FIGURA 10 ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA FdxA DE *H. seropedicae* COM SEQUÊNCIAS DE OUTRAS PROTEÍNAS SIMILARES



O alinhamento foi feito utilizando o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Os resíduos de cisteínas conservados estão indicados na figura nas caixas pretas. (*) Aminoácidos idênticos.

Fer3_Bj – proteína Fer3 de *Bradyrhizobium japonicum*

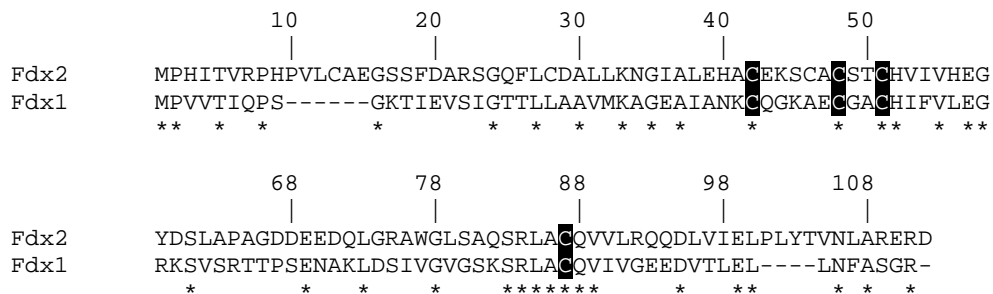
FdIII_Rc – proteína FdIII de *Rhodobacter capsulatus*

FdxA_Ab – proteína FdxA de *Azospirillum brasilense*

4Fe-4S_Bv – ferredoxina 4Fe-4S de *Burkholderia vietnamiensis* G4

FdxA_Hs – proteínas FdxA de *Herbaspirillum seropedicae*

FIGURA 11 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS Fdx1 E Fdx2 DE *H. seropedicae*



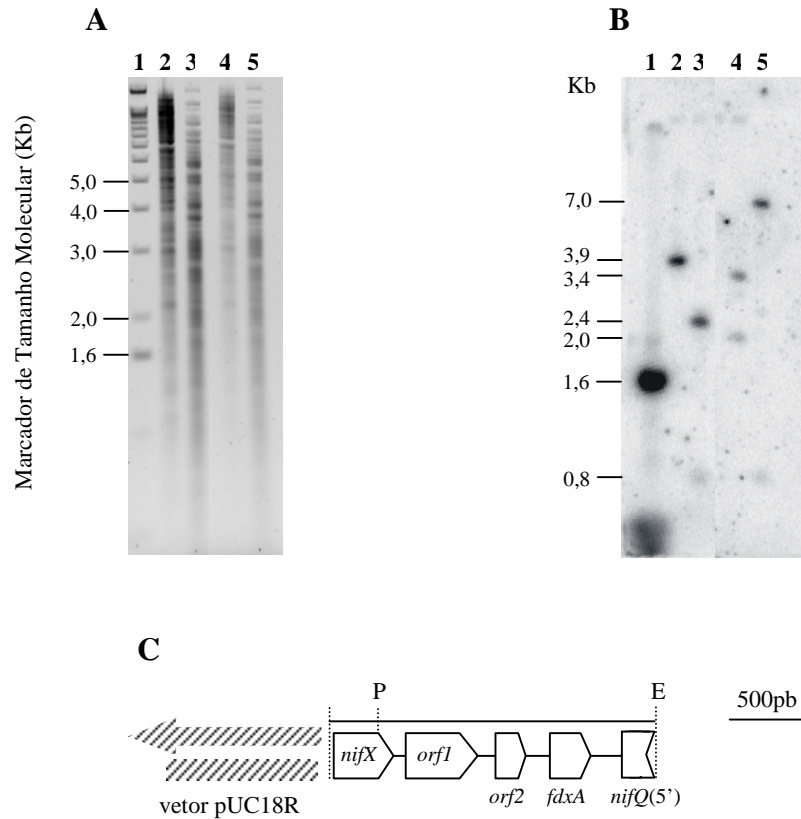
O alinhamento foi feito utilizando o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Os resíduos de cisteínas conservados estão indicados na figura nas caixas pretas. (*) Aminoácidos idênticos.

4.2.1 Mutagênese do Gene *fdxA*

O plasmídeo pALFKC (cassete *lacZ::Km* inserido na mesma orientação de transcrição do gene *fdxA*) foi transformado na estirpe SMR1 de *H. seropedicae*. Baseado na resistência a canamicina e na sensibilidade a tetraciclina (marcador do plasmídeo), foi selecionada uma estirpe mutante, KC6 (cassete na mesma orientação de *fdxA*). A integração do cassete *lacZ::Km* no DNA genômico do *H. seropedicae* foi verificada por hibridização, utilizando como sonda o plasmídeo HS05-MF-037-A04 (*nifX*(5')-*nifQ*(5')), conforme descrito em Material e Métodos (item 3.10.3). O resultado da hibridização é mostrado na Figura 12.

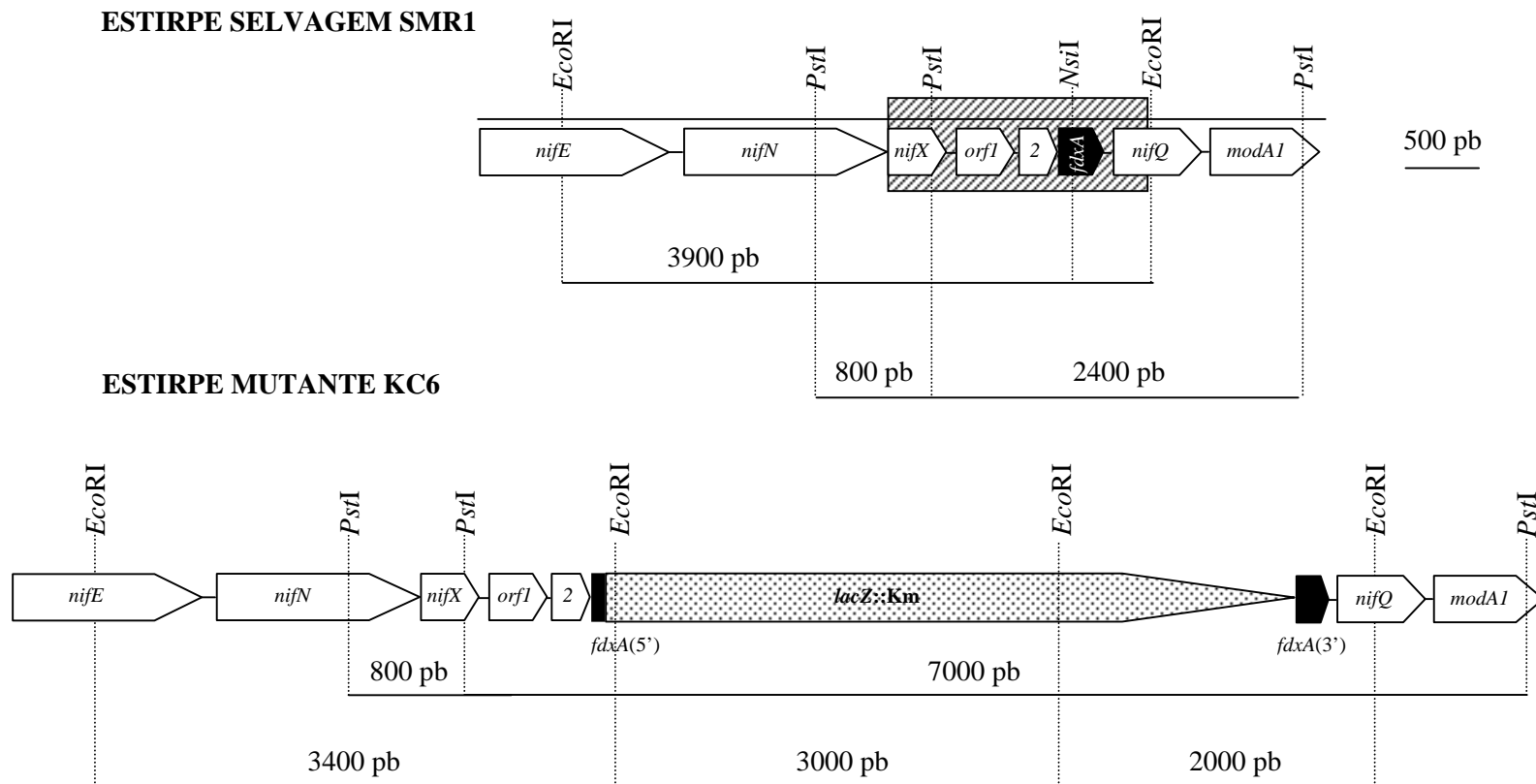
Os perfis de hibridização mostraram que a estirpe mutante KC6 é resultado da inserção do cassete *lacZ-Km* no genoma de *H. seropedicae* por recombinação dupla homóloga. A representação esquemática da região mutagenizada na estirpe KC6 está mostrada na Figura 13.

FIGURA 12 HIBRIDIZAÇÃO DE DNA DO GENOMA DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* SELVAGEM (SMR1) E MUTANTE *fdxA* (KC6) COM A SONDA HS05-MF-037-A04



Painel A: eletroforese em gel de agarose 0.7% (p/v) do DNA genômico das estirpes selvagem (linhas 2 e 3) e mutante KC6 (linhas 4 e 5). As amostras foram digeridas com *EcoRI* (linhas 2 e 4) ou com *PstI* (linhas 3 e 5). Os marcadores de tamanho molecular são apresentados na linha 1. O gel foi corado com brometo de etídeo (item 3.6). Painel B: Hibridização das amostras apresentadas em A. Painel C: esquema indicando o plasmídeo HS05-MF-037-A04 utilizado como sonda digerido com *EcoRI* (E), com destaque para o gene *fdxA*. (P) *PstI*.

FIGURA 13 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO GENÔMICA DAS ESTIRPES SELVAGEM (SMR1) E MUTANTE (KC6) APÓS A INTEGRAÇÃO DO CASSETE *lacZ*-Km



O gene *fdxA* está representado em preto. A caixa listrada no mapa da estirpe selvagem representa o inserto do plasmídeo HS05-MF-037-A04, usado como sonda. As setas indicam o sentido de transcrição.

4.2.2 Ensaios Fisiológicos

A estirpe de *H. seropedicae* contendo o cassete *lacZ*-Km inserido no gene *fdxA* (KC6) foi utilizada para avaliar a expressão do gene em ensaios de atividade de β -galactosidase e a função do gene no contexto da fixação de nitrogênio foi analisada em experimentos de atividade da nitrogenase em meio semi-sólido e experimentos inativação reversível da nitrogenase.

4.2.2.1 Análise transcricional do gene *fdxA* de *H. seropedicae*

Os genes *nifHDKENXorf1orf2* de *H. seropedicae* são transcritos a partir de um promotor do tipo -24/-12 localizado a montante do gene *nifH* (MACHADO et al., 1996; KLASSEN et al., 1999). Análises *in silico* não mostraram a presença de potenciais seqüências consenso de promotores conhecidos e sítios de ligação da proteína NifA na região compreendida entre os genes *nifH* e *fdxA*. Para verificar experimentalmente a presença de promotor na região a montante de *fdxA*, as regiões dos genes *nifX-nifQ* e *orf1-modA1* foram clonadas em vetor contendo o gene *lacZ* sem promotor, pPW452 e pMP220, respectivamente (Tabela 6). Os resultados mostraram níveis basais de atividade de β -galactosidase em todas as condições testadas. Os experimentos também foram efetuados em condições limitantes de molibdênio, devido a presença do grupo de genes *modA1B1C1* a jusante de *fdxA*. Estes resultados confirmam que os genes *nifHDKENXorf1orf2fdxA* *nifQmodA1B1C1* formam um único operon, transcritos a partir do promotor do gene *nifH*, uma vez que a região intergênica *nifQ-modA1* foi analisada e os resultados obtidos também indicam a ausência de promotor neste fragmento (KLASSEN, 2000).

A atividade de β -galactosidase na estirpe de *H. seropedicae* KC6, contendo o gene *lacZ* inserido na mesma orientação de *fdxA*, foi determinada na presença ou ausência de oxigênio e amônio (Tabela 6). Os resultados mostraram que o gene *fdxA* é expresso apenas em condições de fixação de nitrogênio (microaerofilia e baixas

concentrações de amônio) e independente da presença de molibdato no meio de cultura, confirmando a sua provável co-expressão com os genes *nifHDK*.

TABELA 6 ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE EM *H. seropedicae* SMR1 CONTENDO DIFERENTES CONSTRUÇÕES^a

Estirpes/Plasmídeos	Condições	β -galactosidase (nmol ONP.mg proteína ⁻¹ .min ⁻¹)	
		+Mo	-Mo
SMR1/pEMS140 (<i>nifB::lacZ</i>)	+N/+O	3,6 ± 1,2	nd
	+N/-O	7,9 ± 5,6	nd
	-N/+O	6,6 ± 1,3	nd
	-N/-O	815,6 ± 54,3	nd
SMR1/pMPnifX-nifQ (<i>nifX-nifQ::lacZ</i>)	+N/+O	6,4 ± 0,6	0,4 ± 0,3
	+N/-O	7,1 ± 5,0	6,7 ± 3,7
	-N/+O	0,3 ± 0,1	7,9 ± 4,5
	-N/-O	12,1 ± 1,2	8,5 ± 4,2
SMR1/pPWorf1-modA1 (<i>orf1-modA1::lacZ</i>)	+N/+O	14,3 ± 5,3	10,6 ± 2,4
	+N/-O	7,3 ± 2,5	5,2 ± 1,0
	-N/+O	5,3 ± 4,6	9,3 ± 0,5
	-N/-O	10,9 ± 1,9	2,6 ± 2,4
KC6 (<i>fdxA::lacZ-Km</i>)	+N/+O	4,6 ± 3,7	7,9 ± 3,2
	+N/-O	13,2 ± 6,8	28,2 ± 14,1
	-N/+O	12,3 ± 9,4	12,6 ± 7,6
	-N/-O	520,3 ± 7,6	525,8 ± 19,5

^a A atividade de β -galactosidase foi determinada como descrito em Material e Métodos (3.12.3). +N ou -N indicam a presença ou ausência de NH₄Cl 20 mmol/L; +O indica que o experimento efetuado em condições de aerobiose; -O indica O₂ ~1,5%; -Mo indica condições limitantes de MoO₄²⁻; +Mo indica meio contendo MoO₄²⁻ adicionado. (nd) indica condição não ensaiada. Os resultados são a média de três experimentos independentes feitos em triplicata.

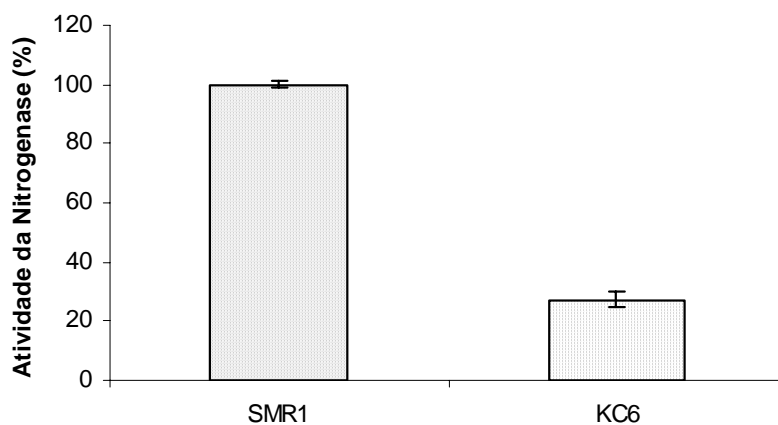
A ferredoxina codificada pelo gene *fdxN*, presente no grupo de genes *nif* em *H. seropedicae*, provavelmente é co-expressa com o gene *nifB* em condições de fixação de nitrogênio (NifA/RpoN-dependente), uma vez que a análise *in silico* indica ausência de uma seqüência consenso de promotor na região *nifB-fdxN* (REGO et al., 2006).

4.2.2.2 Atividade da nitrogenase da estirpe mutante KC6

A atividade da nitrogenase da estirpe de *H. seropedicae* mutante no gene *fdxA* (KC6) foi determinada em condições de fixação de nitrogênio em meio NFbHP semi-sólido suplementado com 0,5 mmol/L de glutamato de sódio (item 3.11.1). Nesta condição a estirpe mutante KC6 apresentou diminuição de aproximadamente 75% na atividade da nitrogenase em relação à estirpe selvagem (Figura 14). Este fenótipo sugere o envolvimento do produto do gene *fdxA* em alguma etapa do processo redução de nitrogênio ou maturação das proteínas Fe ou MoFe. A localização deste gene a jusante dos genes *nifENXorf1orf2* sugere o envolvimento desta ferredoxina na síntese do cofator FeMo ou do grupo P da nitrogenase. A proteína FdxA poderia também atuar como doador de elétrons para a Fe-proteína durante a redução do nitrogênio.

Os genes *nifX* e *orf1* de *H. seropedicae* são essenciais para a atividade da nitrogenase em condições limitantes de ferro e molibdênio, sugerindo o envolvimento do produto destes genes na utilização de ferro ou molibdênio para a atividade da nitrogenase (KLASSEN et al., 2003). Como o gene *fdxA* provavelmente faz parte do operon *nifHDKENXorf1orf2*, o efeito da mutação deste gene na atividade da nitrogenase sob condições de limitação de ferro ou molibdênio foi determinada. A atividade da nitrogenase na estirpe mutante KC6 nestas condições apresentou uma diminuição de 75% na atividade quando comparada com a estirpe selvagem, semelhante à atividade observada na presença de ferro e molibdênio (resultados não apresentados). Estes resultados indicam que o produto de *fdxA* não está envolvido na mobilização de ferro ou molibdênio necessária para a síntese dos cofatores metálicos para a atividade da nitrogenase em *H. seropedicae*.

FIGURA 14 ATIVIDADE DA NITROGENASE DAS ESTIRPES SELVAGEM (SMR1) E MUTANTE (KC6)

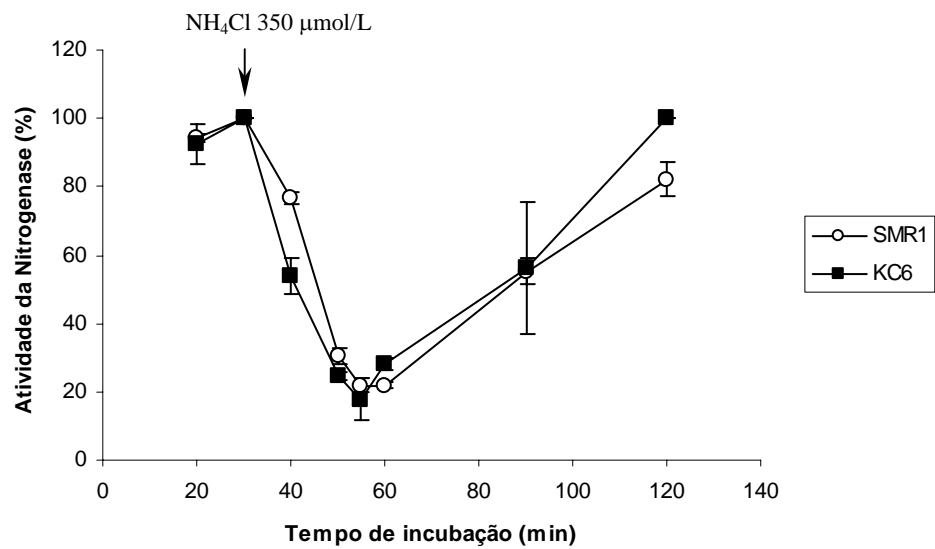


O ensaio foi realizado em meio NFbHP semi-sólido contendo glutamato de sódio 0,5 mmol/L (item 3.11.1). A atividade da nitrogenase máxima (100%) foi de aproximadamente 8,0 nmol de etileno.mg proteín⁻¹.min⁻¹. Os resultados são a média de três experimentos independentes feitos em triplicata.

Em *Azoarcus* sp. o gene *fdxN* que codifica uma ferredoxina 2[4Fe-4S], é co-transcrito com os genes *nifHDK*. Deleção deste gene resultou em uma redução de 81% na atividade da nitrogenase e também afetou a inativação reversível da nitrogenase pela adição de amônio (EGENER et al., 2001).

Em *H. seropedicae*, o gene *fdxA* que codifica uma ferredoxina 2[4Fe-4S] diferente de *fdxN*, também é co-transcrito com os genes *nifHDK* e a estirpe mutante *fdxA⁻* apresentou atividade da nitrogenase reduzida. Esta similaridade levanta a hipótese da participação do produto deste gene na inibição reversível da nitrogenase. Este mutante (KC6) foi ensaiado em experimentos de desligamento da nitrogenase por íons amônio (Figura 15). Os resultados sugerem que o produto do gene *fdxA* não está envolvido neste processo em *H. seropedicae*. A adição de 350 µmol/L de NH₄Cl às culturas selvagem e mutante produziu o desligamento da nitrogenase em ambas as estirpes e religamento da atividade da nitrogenase em torno de 20 minutos após o início do desligamento. Quando se adicionou 1 mmol/L de NH₄Cl às culturas das estirpes selvagem e mutante houve desligamento da nitrogenase, porém não foi observado o religamento durante o tempo do experimento (resultados não apresentados).

FIGURA 15 EFEITO DA ADIÇÃO DE AMÔNIO NA ATIVIDADE DA NITROGENASE



O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos (3.11.2). A seta indica a adição de NH_4Cl 350 $\mu\text{mol/L}$. A atividade da nitrogenase máxima (100%) foi de aproximadamente 8,0 nmol de etileno. $\text{mg proteín}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para estirpe selvagem SMR1 e 75% menor para a estirpe mutante KC6. Os resultados são a média de três experimentos independentes feitos em triplicata.

Muitas bactérias fixadoras de nitrogênio reagem à adição de amônio inativando reversivelmente a nitrogenase e este processo envolve diferentes mecanismos. Em alguns diazotrofos como *R. rubrum* (POPE, MURELL e LUDDEN, 1985), *R. capsulatus* (JOUANNEAU et al., 1989) e *A. brasilense* (FU et al., 1989), a Fe-proteína do complexo da nitrogenase é modificada pós-traducionalmente através da ADP-ribosilação reversível de um resíduo específico de arginina. Entretanto, em outras bactérias, o desligamento da nitrogenase envolve algum mecanismo diferente e pouco conhecido (PIERRARD, LUDDEN e ROBERTS, 1993).

Em *H. seropedicae*, hibridização DNA-DNA não revelou a presença dos genes responsáveis pelo processo de ADP-ribosilação (*draT-draG*) (FU e BURRIS, 1989) e o sequenciamento do genoma de *H. seropedicae* confirmou a ausência destes genes (www.genopar.org).

O mecanismo de desligamento da nitrogenase com a adição de amônio em *H. seropedicae*, mostrou envolver o canal de NH₃ AmtB (NOINDORF et al., 2006), como visto em *A. brasilense* (HUERGO et al., 2006) e *R. capsulatus* (YAKUNIN e HALLENBECK, 2002). Entretanto, nestes organismos o desligamento da nitrogenase em resposta a íons amônio ocorre via ADP-ribosilação (YAKUNIN e HALLENBECK, 2002; HUERGO et al., 2006).

A associação de genes codificando ferredoxinas com genes essenciais para a fixação de nitrogênio sugere que estas proteínas estejam envolvidas neste processo. A presença de um gene de uma ferredoxina (Fd) na região do gene estrutural da nitrogenase redutase (*vnfH*) da nitrogenase alternativa (V-nitrogenase) de *A. vinelandii* sugere o envolvimento desta ferredoxina na transferência direta de elétrons para esta nitrogenase (JOERGER et al., 1990).

Entretanto, alguns genes de ferredoxinas são encontrados posicionados entre os genes *nifENX* e *nifQ* como em *R. capsulatus*, *A. brasilense* e *H. seropedicae* (*fdxA*). (MORENO-VIVIAN et al., 1989; POTRICH et al., 2001; SOUZA, 2003). Em *R. capsulatus*, este gene (*fdxM*) codifica uma ferredoxina 2[4Fe-4S] não

essencial para a fixação de nitrogênio (MORENO-VIVIAN et al., 1989; SAEKI et al., 1991). Outras ferredoxinas foram identificadas em *R. capsulatus* como FdxN (2[4Fe-4S]), FdxA ([3Fe-4S][4Fe-4S]) e FdxC ([2Fe-2S]). Mutações nos genes *fdxN* e *fdxC* indicaram que são necessários para a fixação de nitrogênio (SAEKI et al., 1991).

Alguns genes de ferredoxinas são encontrados associados ao gene *nifB* em *A. vinelandii*, *B. japonicum*, *Anabaena* sp., *Rhizobium meliloti*, *R. rubrum* e *H. seropedicae* (*fdxN*) (JOERGER e BISHOP, 1988; EBELING, NOTI e HENNECKE, 1988; MULLIGAN, BUIKEMA e HASELKORN, 1988; EDGREN e NORLUND, 2005).

O produto do gene *fdxN* é essencial para a atividade da nitrogenase em *H. seropedicae*, uma vez que uma estirpe mutante neste gene foi incapaz de reduzir acetileno em condições de fixação de nitrogênio. Este fenótipo foi revertido através da complementação desta estirpe mutante com uma construção contendo apenas o gene *fdxN* sob controle do promotor *lacZ* (A. Invitti, resultados não publicados).

A localização conservada de genes de ferredoxinas entre genes necessários para a biossíntese do cofator pode indicar o seu papel no processo de fixação de nitrogênio. Em *H. seropedicae*, a localização do gene *fdxA*, entre os genes *nifHDKorf1orf2* e *nifQ* e o gene *fdxN*, associado ao gene *nifB* pode sugerir, juntamente com os dados fisiológicos, um provável envolvimento em alguma etapa da biossíntese do cofator FeMo da nitrogenase.

4.3 ANÁLISE DOS GRUPOS DE GENES *mod* DE *H. seropedicae*

No genoma de *H. seropedicae* foram anotados dois grupos de genes que codificam sistemas de transporte de molibdato do tipo ABC (*modA1B1C1* e *modA2B2C2*). O grupo *modA1B1C1* está localizado na região à jusante dos genes *nifHDKENXorf1orf2fdxAnifQ*, provavelmente formando um único operon sob controle do promotor do gene *nifH* (Tabela 6). (MACHADO et al., 1996; KLASSEN et al., 1999; KLASSEN, 2000; SOUZA, 2003). Um gene do tipo *modE* (*modE1*) similar ao regulador transcricional dependente de molibdato dos genes *modABC* de *E. coli*, está localizado à montante do gene *nifA*, 14,6 kb a montante do gene *nifH*. O segundo grupo *modA2B2C2* está localizado em uma região distinta do genoma contendo o gene *modE2* imediatamente à montante e transcrevendo na direção oposta ao gene *modA2* (Figura 9).

Análise da seqüência do gene *modA1* revelou que codifica uma proteína de 24.645 Da e pI de 9,18 homóloga à proteína ModA de *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 e *Pseudomonas entomophila* L48 (Tabela 7). O produto do gene *modA2* é uma provável proteína de 24.093 Da e pI calculado de 9,16. Esta proteína é homóloga à proteína ModA de *Ralstonia entropia* H16, *Ralstonia entropia* JMP134 e *Ralstonia metallidurans* CH34 (Tabela 7). Como proteínas do tipo ModA são periplasmáticas em bactérias gram-negativas, foram identificadas nas proteínas ModA1 e ModA2 de *H. seropedicae* seqüências sinal envolvidas na translocação destas proteínas para o espaço periplasmático. Na proteína ModA1 foi determinada como seqüência sinal os resíduos N-terminais 1-21 (MLRTLMLACTWLWLLMPVVHA) e na proteína ModA2 os resíduos 1-28 (MSTRSRLNTALGAACAATLMLAAGAAQA) (Figura 16), similares aos descritos na literatura (SCHULTZ et al., 1998; LETUNIC et al., 2006).

Comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas ModA1 e ModA2 de *H. seropedicae* indica identidade de 25%. As proteínas ModA de *E. coli* e ModA2 de *A. vinelandii* tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas. Na

forma de monômero estas proteínas são compostas de dois domínios estruturalmente semelhantes, designados N- e C-terminais, e separados pela região de ligação ao molibdato (HU et al., 1997 e LAWSON et al., 1998). Também foram definidos os aminoácidos que interagem com MoO_4^{2-} . Em ambas as proteínas o oxianion interage com grupos amida da cadeia principal e hidroxilas de cadeias laterais de alguns aminoácidos. Na proteína ModA de *E. coli* sete pontes de hidrogênio são formadas entre molibdato e a proteína. São quatro pontes de hidrogênio doadas por grupos NH da cadeia principal (resíduos Ser38, Ser66, Ala152 e Val181) e três de grupos OH da cadeia lateral (resíduos Ser38, Ser66 e Tyr199) (HU et al., 1997). Em ModA2 de *A. vinelandii*, também foram observadas interações em aminoácidos equivalentes (LAWSON et al., 1998).

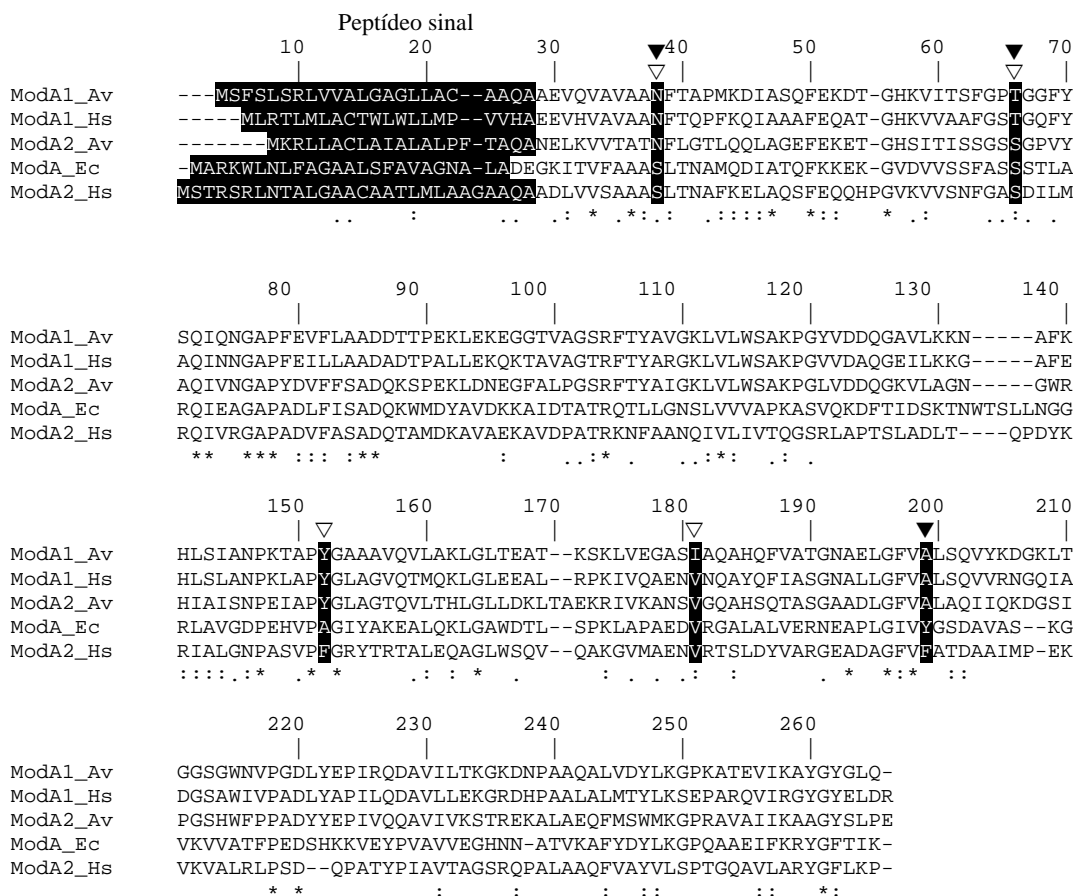
Com base no alinhamento das proteínas ModA1 e ModA2 de *H. seropedicae* com as proteínas ModA de *E. coli* e *A. vinelandii*, os aminoácidos que potencialmente interagem com o oxianion podem ser apontados (Figura 16).

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DOS PRODUTOS DOS GENES *modA1B1C1* e *modA2B2C2* DE *H. seropedicae*

GENE	ORGANISMO	IDENTIDADE ^a (%)	SIMILARIDADE ^a (%)	NÚMERO DE ACESSO
ModA1	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	66	81	YP_001101661
	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2	68	84	YP_982267
	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	64	79	YP_607903
ModA2	<i>Raltonia entrophia</i> H16	71	81	YP_725193
	<i>Raltonia entrophia</i> JMP134	71	84	YP_294860
	<i>Raltonia metallidurans</i> CH34	68	78	YP_582726
ModB1	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	73	86	YP_315042
	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP	70	82	ZP_00419364
	<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath	74	87	YP_113837
ModB2	<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	81	91	YP_582725
	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	81	89	YP_294859
	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	80	89	YP_725192
ModC1	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP	61	73	ZP_00419365
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	63	74	YP_001171882
	<i>Azoarcus</i> sp. BH72	60	71	YP_935339
ModC2	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	68	82	YP_725191
	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	64	81	YP_294858
	<i>Ralstonia pickettii</i> 12J	66	80	ZP_01662211
ModE1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	70	81	YP_001115213
	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	80	90	YP_553832
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	41	58	YP_001171885
ModE2	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	53	70	YP_546401
	<i>Novosphingobium</i> <i>aromaticivorans</i> DSM 12444	60	70	YP_497784
	<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath	51	64	YP_113805

^a determinado pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) (item 3.9.2)

FIGURA 16 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ModA1 E ModA2 DE *H. seropedicae* COM OUTRAS PROTEÍNAS ModA



As seqüências do peptídeo sinal das proteínas estão indicadas na figura e compreendem os primeiros 20-28 aminoácidos das proteínas (SCHULTZ et al., 1998 e LETUNIC et al., 2006). Os resíduos de aminoácidos que potencialmente interagem com o oxianion estão marcados com triângulos. Triângulos brancos, aminoácidos que interagem com o oxianion através da cadeia principal e triângulos pretos, resíduos que interagem com a cadeia lateral (HU et al., 1997 e LAWSON et al., 1998). Os números dos resíduos citados no texto referem-se aos números deste alinhamento. O alinhamento foi feito com o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994). A. *vinelandii* (Av), *H. seropedicae* (Hs), *E. coli* (Ec).

(*): aminoácidos idênticos (9%)

(:): aminoácidos fortemente similares (16%)

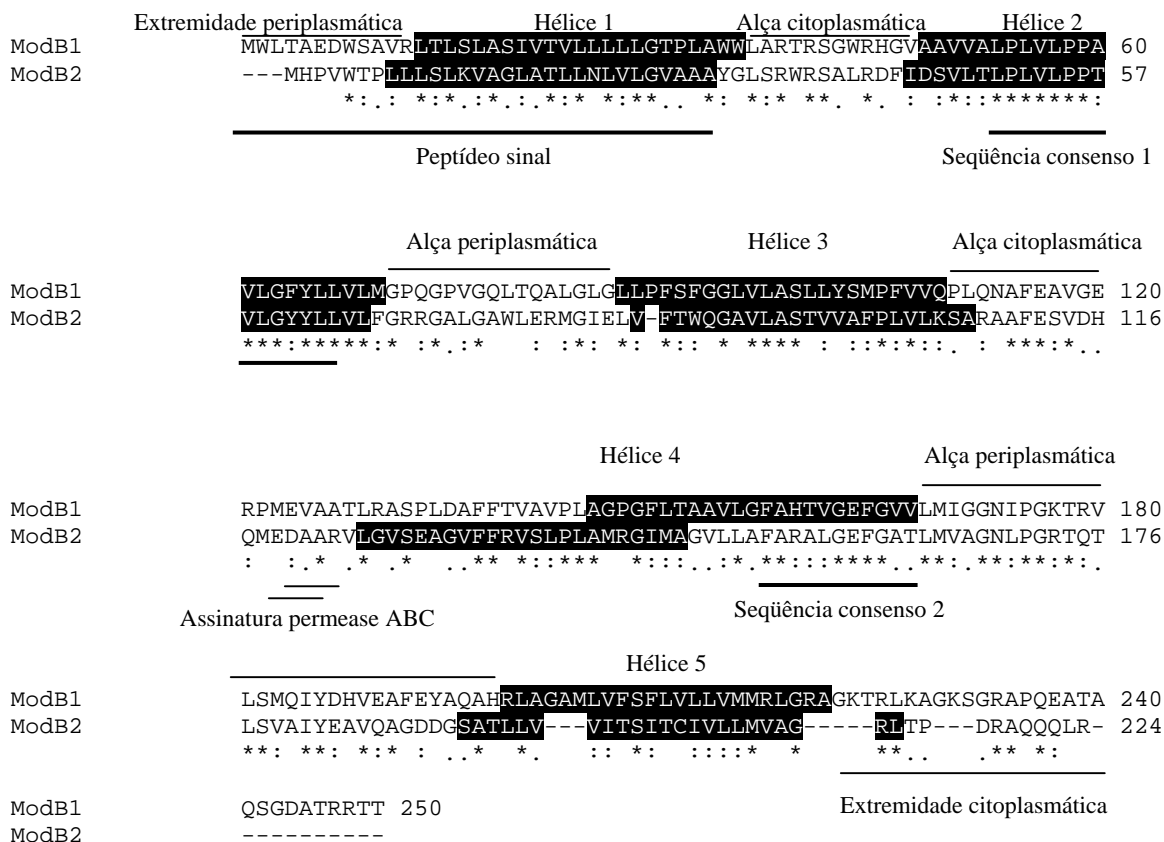
(.): aminoácidos fracamente similares (13%)

As porcentagens de similaridade e identidade da seqüência de aminoácidos das proteínas ModB1 (26.549 Da) e ModB2 (23.872 Da) de *H. seropedicae* com proteínas do tipo ModB de outros organismos está descrita na Tabela 7. As proteínas ModB de *H. seropedicae* possuem 35% de resíduos de aminoácidos idênticos. Baseado na sua seqüência primária foram preditas cinco hélices transmembrana de 23 resíduos de aminoácidos, sugerindo que estas proteínas provavelmente formam um canal transmembrana envolvido na passagem de molibdato e/ou outro oxiânion para o interior da célula (TUSNÁDY, 1998). Também foram identificadas seqüências sinal de 33 e 30 aminoácidos em ModB1 e ModB2, respectivamente (Figura 17).

Baseado na comparação da seqüência de aminoácidos de várias proteínas ModB descritas foram identificadas algumas seqüências consenso entre elas. A primeira seqüência (LPLVLPP(V/T/S)VhG(F/Y)XL) está localizada dentro da segunda hélice transmembrana, onde h representa um aminoácido hidrofóbico e X qualquer aminoácido (Figura 17). Esta seqüência foi encontrada nos componentes permease dos sistemas de transporte de sulfato (CysU e CysW) e fosfato (PstA e PstC), porém não foi localizada nas permeases dos transportadores de histidina e maltose, sugerindo que esta seqüência desempenhe uma função significativa no transporte de oxiânions (SELF et al., 2001).

Uma segunda seqüência consenso (FAR(S/T)LGEFG(A/V)(T/V)) foi encontrada na quarta hélice transmembrana de ModB1 ou na alça periplasmática de ModB2 entre as hélices 4 e 5; este motivo está presente apenas em componentes permease de sistemas de transporte de molibdato (SELF et al., 2001) (Figura 17). Também foi identificada uma seqüência (EQAA) localizada em uma alça citoplasmática entre as hélices 3 e 4 representando uma assinatura característica de permeases de sistemas de transporte do tipo ABC. Esta região representa um ponto de contato com o componente ATPase destes sistemas (SELF et al., 2001) (Figura 17).

FIGURA 17 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ModB1 e ModB2 DE *H. seropedicae*



A sequência do peptídeo sinal e as hélices transmembrana das proteínas estão indicadas na figura e foram determinadas pelos programas SMART (SCHULTZ et al., 1998; LETUNIC et al., 2006) e SOSUI (HIROKAWA, BOON-CHIENG e MITAKU, 1998). As alças periplasmáticas e citoplasmáticas, as sequências consenso 1 e 2 e a assinatura característica dos componentes permease dos transportadores do tipo ABC estão indicados na figura. O alinhamento foi feito com o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994)

(*) aminoácidos idênticos (35%)

(:) aminoácidos fortemente similares (24%)

(.) aminoácidos fracamente similares (12%)

A terceira proteína componente do sistema de transporte de molibdato é a ATPase ModC. As proteínas ModC1 (40.188 Da) e ModC2 (24.532 Da) de *H. seropedicae* possuem baixa identidade (20%) entre si e tamanhos bastante diferentes (Figura 18). A comparação da seqüência de aminoácidos destas proteínas com outras do tipo ModC estão descritas na Tabela 7.

Análise de alinhamento da seqüência de aminoácidos de várias ATPases de sistemas de transporte ABC identificaram quatro pequenos motivos conservados (LINTON e HIGGINS, 1998). Entre eles estão os motivos Walker A (GXXGXGKST) onde X é qualquer aminoácido e Walker B (hhhhDEPT) onde h é um resíduo hidrofóbico. Estes motivos estão envolvidos diretamente na ligação e hidrólise de ATP. Também foram identificados uma assinatura ABC (LSGG) e um motivo formado por um resíduo de histidina conservado, localizado aproximadamente 30 aminoácidos a jusante do resíduo de ácido aspártico do motivo Walker B, normalmente precedido por quatro resíduos hidrofóbicos e seguido por um resíduo carregado (hhhhH+/-), onde +/- é um resíduo carregado (LINTON e HIGGINS, 1998).

Apesar das proteínas ModC1 e ModC2 apresentarem diferenças na estrutura primária, foram identificados os quatro motivos característicos dos componentes ATPases de sistemas de transporte do tipo ABC, sugerindo a funcionalidade de ambas as proteínas (Figura 18).

FIGURA 18 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ModC1 E ModC2 DE *H. seropedicae*

```

Walker A
ModC1      MKQAMVGPSTIAQPGIIAKMAYGYGGAGEFQLDLDTLPGQGVSALSGPSGCGKTTFLRCM 60
ModC2      -----MSLDLQIQQLHASD--RRFALDLSLVSASQRI-VLYGPSGAGKSLTLKAI 48
           ::      * *      :. .      . * * * * . * . . * : . * * * * . * * : * : :

ModC1      AGLLRPSRGYLEVNGEVWQDSQRQYFLPTHRRALGYVFQEASLLPHLSVSRNLDYGARR- 119
ModC2      AGLMRPDSGRIRLNGRTLNFNSNEGIDLPVQGRNVAYLFQDYALFPHLSVAQNIAFGLARG 108
           * * * : * * . * : . : * * . * : . * : * * : : * : * * * * : * : *

Assinatura ABC      Walker B
ModC1      ---SGAVSSAASRQKIIDLGLIAALLQSMPSALSGGERQRVAIARALFTAPRLLLMDEPM 176
ModC2      CFNLRPAQHPAVAKWLRAFELDDIAHSRPAQISGGQRQRVALARALVAEPDILLLDEPF 168
           :. . : * : : : : : * * : * * * : * * * * * * * * * : * : * * * * :

Motivo 4
ModC1      AALDNRKRDIPLPYLERLRDELAIPILYISHHPEEIARLADTLVLMRQGRCLASGPLTTL 236
ModC2      SALDLSLRERMRAELAELQAQLQVPMLLITHDPADVEALGQTVFELRDGRLHQG----- 222
           : * * . . : . * . * : * : * * * * * * * : : * . : * . : * * * .

ModC1      LSRLDLPLAHAEDAGAVIEAKVAAHDETYHLTRLVLAGGEIFVPRELPGVQSVRLQIHA 296
ModC2      -----

ModC1      RDVSLALSPSHDSSILNRLSATVCLKLAPAQHPAHLAVLDAGGEQLLARITRRSCDQLAL 356
ModC2      -----

ModC1      VAGQPVWAQIKSVALL 372
ModC2      -----

```

Os motivos característicos das proteínas ModC1 e ModC2 (Walker A e B, assinatura ABC e motivo 4) estão indicados na figura. O alinhamento foi feito com o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994).

(*) aminoácidos idênticos (20%)

(:) aminoácidos fortemente similares (13%)

(.) aminoácidos fracamente similares (7%)

Foram identificados em *H. seropedicae* dois genes (*modE1* e *modE2*) que codificam prováveis proteínas envolvidas na regulação da transcrição dos genes *modABC* (Figura 19). A similaridade e identidade das seqüências de aminoácidos das proteínas ModE1 e ModE2 com proteínas ModE de outros organismos está mostrada na Tabela 7.

ModE1 é uma proteína de 299 aminoácidos (Q9F4K4) com massa molecular calculada de 28.283 Da e pI de 9,65, enquanto ModE2 possui 122 aminoácidos (EF666058.1) e massa molecular calculada de 13.045 Da e pI de 9,73. As seqüências destas proteínas foram alinhadas e os domínios funcionais preditos (SCHULTZ et al., 1998; LETUNIC et al., 2006) (Figura 19).

A proteína ModE1 possui na porção N-terminal um domínio hélice-volta-hélice (HTH) compreendido entre os resíduos 24-88. Na região C-terminal está presente um provável domínio de ligação a molibdato que consiste de dois subdomínios Mop repetidos em seqüência (DiMop) delimitados pelos resíduos 129-192 e 201-264, respectivamente (SCHULTZ et al., 1998; LETUNIC et al., 2006).

A proteína ModE2 possui um domínio HTH entre os resíduos 21-85 (SCHULTZ et al., 1998; LETUNIC et al., 2006), similar ao domínio N-terminal de ModE de outros organismos (Tabela 7).

FIGURA 19 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS ModE1 e ModE2 DE *H. seropedicae*

		Hélice-volta-hélice (HTH)			
ModE1	MSTLPATD	TLLSSELKLVHRLD	Q RFFALLDAIAQTGSINRAASTAGYSYKAWMLLESA	60	
ModE2	---	MNSKTLRVRVMQGETIAFG	P GKADLLQAIGR TGSISGAAREMEMSYRRAWLLVEEM	57	
	:	: . * :	***:*.:***. **	***:***:*.:	
ModE1	G NLVNGALIE	T VTGGKGGG	T RLTPAAV	E LLAVWRELQRRNLEFLHRQETWLNQLPALAG	120
ModE2	N RCFASPLV	T TATGGSRGGG	A VTALGQ	E VLTRYRRQK-----AAASIAA	103
 * :	*.***. ***: :*. . * : * : * . :	. : * .	
		MopI			
ModE1	LLRRMSMK	T SARNQFAGVISAIDTGPVTTQVTVTIAGAQ	E IVATMTTTAANRLKLRIGSN	180	
ModE2	DLRHLHTLMNAPQ	P DDGDA-----		122	
		***: . * :	*		
		MopII			
ModE1	A IALIKSSAVL	V TDFAGF	S LARNQFEGTVSRVERGAVSSLVVLTLPGGACMTASLTND	240	
ModE2	-----				
ModE1	A IDALSLAVGQTATAVFKAYAVM	V AVQQD		269	
ModE2	-----				

O alinhamento foi feito com o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994). Os domínios hélice-volta-hélice (HTH), MopI e MopII estão destacados na caixa preta e indicados na figura. Estes domínios foram determinados utilizando o programa SMART (SCHULTZ et al., 1998 e LETUNIC et al., 2006).

- (*) aminoácidos idênticos (38%)
- (:) aminoácidos fortemente similares (12%)
- (.) aminoácidos fracamente similares (18%)

4.3.1 Atividade da Nitrogenase na Estirpe Mutante *modB2*

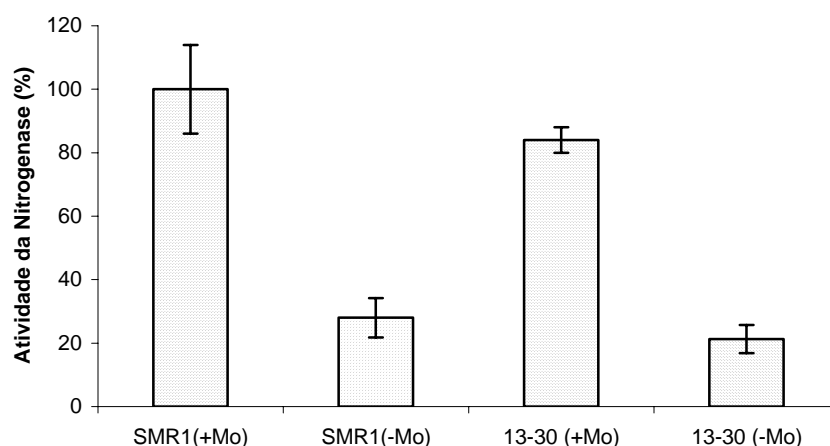
O plasmídeo pABKC (cassete *lacZ::Km* inserido na mesma orientação de transcrição do gene *modB2*) foi transformado na estirpe selvagem de *H. seropedicae*. Com base na resistência a canamicina e na sensibilidade a tetraciclina (marcador do plasmídeo), foi selecionada a estirpe mutante 13-30 (cassete na mesma orientação de *modB2*). Esta estirpe mutante foi utilizada em ensaios de atividade da nitrogenase (item 3.11.1).

Em condições de fixação de nitrogênio na presença ou em condições limitantes de molibdato a estirpe mutante 13-30 apresentou atividade da nitrogenase semelhante àquela apresentada pela estirpe selvagem (Figura 20). Este resultado difere daquele obtido por KLASSEN (2000), que notou que a atividade do mutante *modA1* é significativamente menor do que a estirpe selvagem em condições limitantes de MoO_4^{2-} . A atividade da nitrogenase do mutante *modA1* somente foi semelhante à estirpe selvagem quando a concentração de molibdato adicionado no meio foi superior a 10 $\mu\text{mol/L}$. Entretanto, KLASSEN (2000) observou que a estirpe selvagem apresentou atividade mesmo quando molibdato não foi adicionado ao meio, enquanto que os resultados apresentados aqui mostram que a atividade da nitrogenase da estirpe selvagem apresentou queda de aproximadamente 75% na atividade da nitrogenase em condições limitantes de molibdato. Isso ocorreu provavelmente devido à diferenças nas condições do ensaio. Para remover traços de MoO_4^{2-} acumulado na célula, o pré-inóculo das estirpes selvagem e mutante *modB2* foram repicadas três vezes em meio NFbHPN líquido tratado com carvão ativo para remover MoO_4^{2-} . Esse tratamento possivelmente resultou em depleção severa de MoO_4^{2-} e no decréscimo observado na atividade da nitrogenase na estirpe selvagem.

Estes resultados sugerem que o grupo de genes *modA1B1C1* presente na região dos genes *nif* e expresso provavelmente sob controle do promotor do gene *nifH*, é suficiente para garantir a atividade da nitrogenase nas condições ensaiadas, enquanto que o segundo grupo de genes de transporte de molibdato (*modA2B2C2*)

provavelmente está envolvido com o transporte deste oxianion para a síntese das demais molibdoenzimas.

FIGURA 20 - ATIVIDADE DA NITROGENASE DAS ESTIRPES SELVAGEM (SMR1) E MUTANTE NO GENE *modB2* (13-30) DE *H. seropedicae*

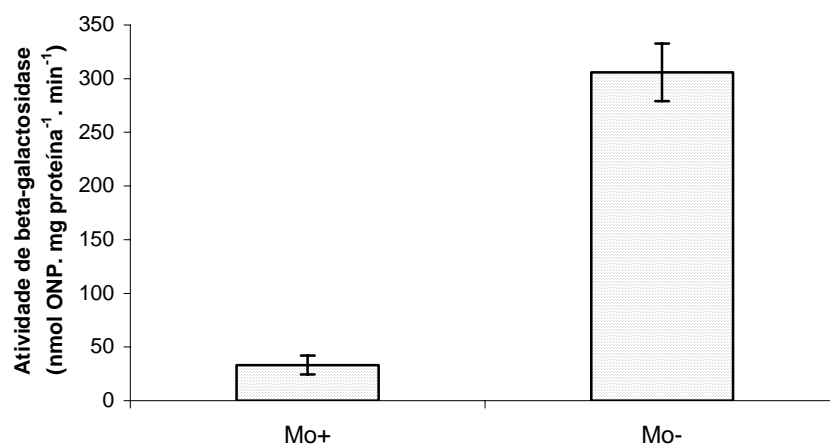


As estirpes foram cultivadas em meio NFbHP semi-sólido contendo glutamato de sódio 0,5 mmol/L (item 3.11.1). A atividade da nitrogenase máxima (100%) foi de aproximadamente 12 nmol de etileno.mg proteína⁻¹.min⁻¹. (+Mo) indica a presença de molibdato de sódio adicionado ao meio de cultura e (-Mo) indica condições limitantes de molibdato utilizando meio tratado com carvão ativado (item 3.2). Os resultados são uma média de três experimentos independentes feitos em triplicata.

4.3.2 Análise Transcricional do Gene *modB2* de *H. seropedicae*

A atividade de β -galactosidase na estirpe de *H. seropedicae* mutante 13-30, contendo o gene *lacZ* sem promotor inserido na mesma orientação do gene *modB2*, foi determinada em condições limitantes de molibdato (Figura 21). Para isto o meio foi depletado de MoO_4^{2-} como descrito em Material e Métodos (item 3.2). Os resultados sugerem que nas condições ensaiadas a expressão do gene *modB2* é regulada pela presença de molibdato no meio. Em condições limitantes de molibdato (Mo-) houve expressão do gene *modB2* revelado pela atividade de β -galactosidase, enquanto que na presença de molibdato adicionado ao meio foram observadas apenas atividades basais. Estes resultados estão de acordo com a análise *in silico* da provável região promotora dos genes *modA2B2C2* localizada a montante de *modA2* (Figura 5 e 25). Esta região possui uma seqüência consenso para ligação da proteína ModE, regulador transcricional dependente de molibdato dos genes *modABC* (GRUNDEN et al., 1996; McNICHOLAS, CHIANG e GUNSALUS, 1996; McNICHOLAS, RECH e GUNSALUS, 1997; TAO et al., 2005).

FIGURA 21 - ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE EM *H. seropedicae* ESTIRPE MUTANTE *modB2* (13-30)



As estirpes foram cultivadas em 3 mL de meio NFbHPN com D.O.₆₀₀ inicial de ~0,2 e mantidas em agitador rotatório a 30°C por 7 horas. A determinação da atividade de β -galactosidase foi realizada como descrito em Material e Métodos (3.11). (Mo+) indica a presença de molibdato de sódio adicionado ao meio de cultura e (Mo-) indica condições limitantes de molibdato utilizando meio tratado com carvão ativado (item 3.2).

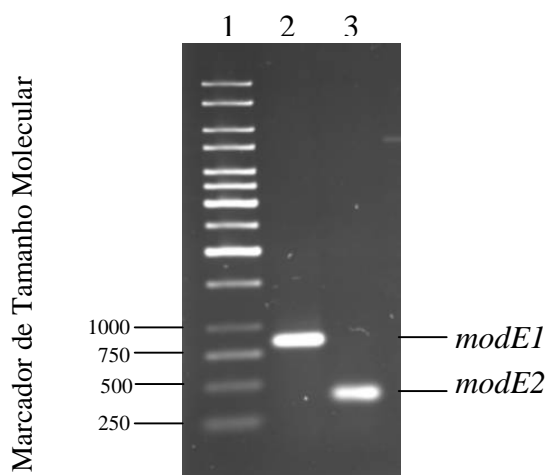
4.4 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO DOS GENES *modE1* E *modE2*

As seqüências que codificam as proteínas ModE1 e ModE2 de *H. seropedicae* foram amplificadas utilizando-se DNA genômico como molde (item 3.12) (Figura 22). Os produtos de PCR *modE1* (874 pb) e *modE2* (415 pb) foram clonados em plasmídeo pCR[®]2.1 (Invitrogen[™]) dando origem aos plasmídeos pCR2.1modE1 e pCR2.1modE2, respectivamente. Os fragmentos destes plasmídeos foram liberados e clonados em pET28a(+) dando origem aos plasmídeos pET28amodE1 e pET28amodE2, respectivamente (item 3.12).

Os genes *modE1* e *modE2* foram clonados nos sítios *NdeI* e *BamHI* do vetor de expressão pET28a(+) (pET28amodE1 e pET28amodE2). Este vetor contém elementos importantes como o gene *lacI* que codifica uma proteína repressora capaz de ligar na região operadora *lac* e um promotor T7, específico somente para a T7 RNA polimerase (não reconhecido pela RNA polimerase bacteriana). Neste sistema as proteínas ModE1 e ModE2 são expressas contendo uma cauda N-terminal de 6 resíduos de histidina (Novagen).

Os plasmídeos de expressão pET28amodE1 e pET28amodE2 foram transformados em *E. coli* BL21(DE3) a qual possui em seu genoma o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*, reprimido pelo repressor LacI. Quando um indutor (lactose ou IPTG) está presente a transcrição da T7 RNA polimerase é ativada.

A expressão das proteínas His-ModE1 e His-ModE2 foi induzida pela adição de lactose ou IPTG nas temperaturas 20, 30 e 37°C. A proteína His-ModE2 foi expressa em grande quantidade na fração solúvel em todas as condições testadas, apresentando-se mais solúvel quando induzida com IPTG em ambas as temperaturas. A proteína His-ModE1 sempre foi encontrada na fração insolúvel, independente do indutor da expressão (IPTG ou lactose) ou temperatura de crescimento.

FIGURA 22 - AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *modE1* E *modE2* de *H. seropedicae*

Eletroforese em gel de agar 1% (p/v) dos produtos de PCR da reação de amplificação dos genes *modE1* e *modE2*. Os produtos amplificados estão indicados na figura. O gel foi corado com brometo de etídeo (item 3.6).

Linha 1 Marcador de tamanho molecular 1 Kb ladder (Gibco)

Linha 2 Produto de amplificação contendo o gene *modE1*

Linha 3 Produto de amplificação contendo o gene *modE2*

4.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE1

Diferentes procedimentos foram utilizados para se obter His-ModE1 na forma solúvel como diferentes temperaturas de indução (37, 30, 20°C), choque térmico, uso de lactose como indutor e diferentes formulações de tampão de lise (pH, força iônica e diferentes sais), porém em todas as condições testadas a grande maioria da proteína expressa permaneceu na fração insolúvel (resultados não apresentados). A proteína ModE de *E. coli* foi super-expressa e purificada fundida a uma cauda de resíduos de histidinas ou na forma nativa (GRUNDEN et al., 1996; McNICHOLAS, RECH e GUNSALUS, 1997; HALL et al., 1999; GRUNDEN et al., 1999). Uma forma N-terminal truncada de ModE de *E. coli*, contendo o domínio de ligação a molibdato na porção C-terminal foi também purificada na forma solúvel complexada a molibdato e tungstato (GOURLEY et al., 2001). Diferentes procedimentos e tampões foram utilizados nestas purificações e em todos os casos a proteína permanecia na fração solúvel (GRUNDEN et al., 1996; ANDERSON et al., 1997; McNICHOLAS, RECH e GUNSALUS, 1997; HALL et al., 1999; GOURLEY et al., 2001). Entretanto algumas formas mutantes da proteína ModE de *E. coli* capazes de reprimir o promotor *modA* independente de molibdato formaram corpos de inclusão quando foram super-expressas. A purificação destas proteínas na forma solúvel foi possível diminuindo-se a temperatura de indução para 23°C (GRUNDEN et al., 1999). As proteínas MopA e MopB de *R. capsulatus*, dois reguladores transcricionais dependentes de molibdato, homólogos a ModE, foram super-expressos em *E. coli* na forma solúvel. Proteínas contendo o domínio Mop implicadas na homeostase de molibdênio em *Sporomusa ovata*, *Eubacterium acidaminophilum* e *Azotobacter vinelandii* também foram purificadas como proteínas solúveis (DELARBRE et al., 2001; WAGNER, STUPPERICH e KRATKY, 2000; WIETHAUS et al., 2006).

Devido a dificuldade de se obter His-ModE1 de *H. seropedicae* solúvel um procedimento para solubilização dos corpos de inclusão e redobrimento da proteína

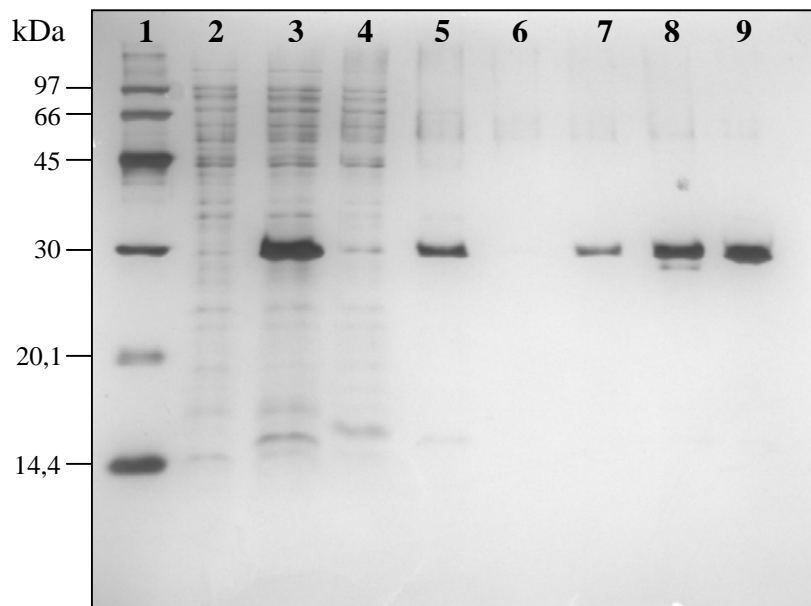
desnaturada foi desenvolvido. As proteínas de corpos de inclusão são geralmente inativas e desnaturadas (SINGH e PANDA, 2005). Contudo, sua alta densidade permite que sejam isolados por centrifugação. Além disso, são expressas em grande quantidade e protegidas de degradação proteolítica. A proteína His-ModE1 de *H. seropedicae* super-expressa em *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET28amodE1 representou 40% da quantidade total de proteína celular. Para o rompimento das células foi utilizada a combinação de lisozima e sonicação. Estes tratamentos diminuem a quantidade de restos celulares que podem sedimentar juntamente com os corpos de inclusão e contaminar a preparação da proteína. A sonicação também auxilia na quebra do DNA total da célula. O lisado celular foi centrifugado resultando em um sobrenadante (S/N1) e um sedimento (corpos de inclusão) (Figura 23). Etapas de lavagem dos corpos de inclusão com tampão contendo baixa concentração de agente caotrópico (uréia 2M) e detergente (Triton X-100 0,5%) foram incluídos para remover proteínas contaminantes e restos celulares que poderiam estar adsorvidos no agregado hidrofóbico de His-ModE1. As frações sobrenadante (S/N2 e S/N3) das duas etapas de lavagem continham baixas concentrações de His-ModE1 (Figura 23). Apesar das perdas de proteína na lavagem dos corpos de inclusão estas etapas foram indispensáveis para reduzir a quantidade de contaminantes na preparação final. Entretanto, as frações S/N2 e S/N3 poderiam ser aplicadas na coluna Hi-Trap Ni²⁺ para recuperar a proteína perdida.

Os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão contendo uréia 8M, um forte agente desnaturante que rapidamente desnatura e solubiliza as proteínas dos corpos de inclusão (BENNION e DAGGETT, 2003). Numa primeira tentativa de obter His-ModE1 renaturada e ativa, a fração contendo proteína solubilizada com uréia 8 mol/L foi submetida à diálise em tampão sem agente desnaturante antes de ser aplicada à coluna de afinidade. Entretanto, durante a diálise foi observada a formação de agregados, inviabilizando a aplicação na coluna cromatográfica (dados não apresentados).

Em uma segunda tentativa, His-ModE1 solubilizada em tampão contendo uréia 8 mol/L foi aplicada na coluna de afinidade e renaturada na matriz da própria coluna através da lavagem com gradiente decrescente de uréia. As moléculas de proteína ligadas na matriz da coluna têm mobilidade restrita, reduzindo interações intermoleculares e, portanto, a formação de agregados em concentrações intermediárias de agente desnaturante é dificultada. Além disso, o tempo de remoção de uréia é muito menor neste procedimento.

A proteína His-ModE1 renaturada foi então eluída da coluna em gradiente de imidazol na forma solúvel e dialisada. Apresentou pureza de 98,1%, determinada por análise densitométrica de gel de poliacrilamida corado com Coomassie blue R-250 (Figura 23) e rendimento de aproximadamente 4% (Tabela 8). A concentração final obtida foi de 10 μ M (calculado como monômero), não sendo observada a formação de agregados.

FIGURA 23 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE1 SUPER-EXPRESSA EM *E. coli*



Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS (SDS-PAGE). O gel foi corado com Coomassie blue R-250.

Linha 1 - Marcador de massa molecular (kDa) (GE Healthcare)

Linha 2 - Lisado de *E. coli* B121(DE3) (pET28amodE1) antes da indução

Linha 3 - Lisado de *E. coli* B121(DE3) (pET28amodE1) após indução com IPTG 0,5 mmol/L

Linha 4 - Fração S/N1

Linha 5 - Fração S/N2

Linha 6 - Fração S/N3

Linha 7 - Precipitado após solubilização dos corpos de inclusão

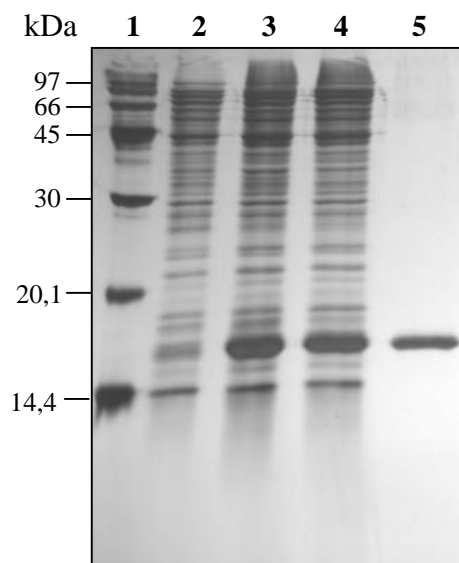
Linha 8 - Fração de proteína solubilizada com uréia 8 mol/L (S/N4)

Linha 9 - His-ModE1 purificada

4.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE2

A proteína His-ModE2 superexpressa em *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET28amodE2 estava predominantemente na forma solúvel (Figura 24), em contraste com a His-ModE1. A diferença no comportamento destas proteínas pode ser devido ao menor tamanho e menor quantidade de aminoácidos hidrofóbicos. A proteína His-ModE2 foi purificada da fração solúvel através de procedimento padrão de purificação por cromatografia de afinidade. Contudo, durante diálise da proteína purificada foi observada a formação de precipitado, diminuindo drasticamente o rendimento da proteína. Para evitar a precipitação durante este procedimento, as frações de proteína eluídas da coluna, contendo imidazol, foram diluídas pela adição de glicerol até atingir uma concentração de 50% (v/v) de glicerol e a preparação foi armazenada a -70°C . A pureza da proteína His-ModE2 foi de 98,2% (20 μM , calculada como monômero) (Tabela 8), determinada por análise densitométrica de gel de poliacrilamida corado com Coomassie blue R-250.

FIGURA 24 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-ModE2 SUPER-EXPRESSA EM *E. coli*



Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS (SDS-PAGE). O gel foi corado com Coomassie blue R-250.

Linha 1 - Marcador de massa molecular (kDa) (GE Healthcare)

Linha 2 - Lisado de *E. coli* B121(DE3) (pET28amodE2) sem indução

Linha 3 - Lisado de *E. coli* B121(DE3) (pET28amodE2) após indução com IPTG 0,5 mmol/L

Linha 4 - Fração solúvel

Linha 5 - His-ModE2 purificada

TABELA 8 – RESUMO DA PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 e His-ModE2 DE *H. seropedicae*

ETAPAS	PROTEÍNA TOTAL (mg)	RENDIMENTO DA ETAPA (%)	RENDIMENTO GLOBAL (%)
His-ModE1			
Extrato bruto ^a	38,8	100	100
S/N4	7,08	18,2	18,2
His-ModE1 purificada	1,5	21,2	3,9
His-ModE2			
Extrato bruto ^a	38,4	100	100
Fração solúvel	29,3	76,2	76,2
His-ModE2 purificada	4,0	13,7	10,4

^a 250 mL de culturas de BL21(DE3) contendo os plasmídeos pET28amodE1 ou pET28amodE2 induzidas com IPTG 0,5 mmol/L à 37°C

4.7 INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *modA2*

A proteína ModE de *E. coli* regula negativamente a transcrição dos genes *modABC* em resposta a disponibilidade de molibdato e esta regulação é baseada na ligação do complexo ModE-molibdato à seqüências de ligação conservadas em regiões promotoras dos genes alvo (SELF et al., 2001).

A ligação das proteínas His-ModE1 e His-ModE2 a um DNA alvo foi verificada por ensaios de mobilidade em gel. Este método é baseado na observação de que complexos de proteína e DNA migram através de um gel de poliacrilamida não desnaturante mais lentamente que DNA livre.

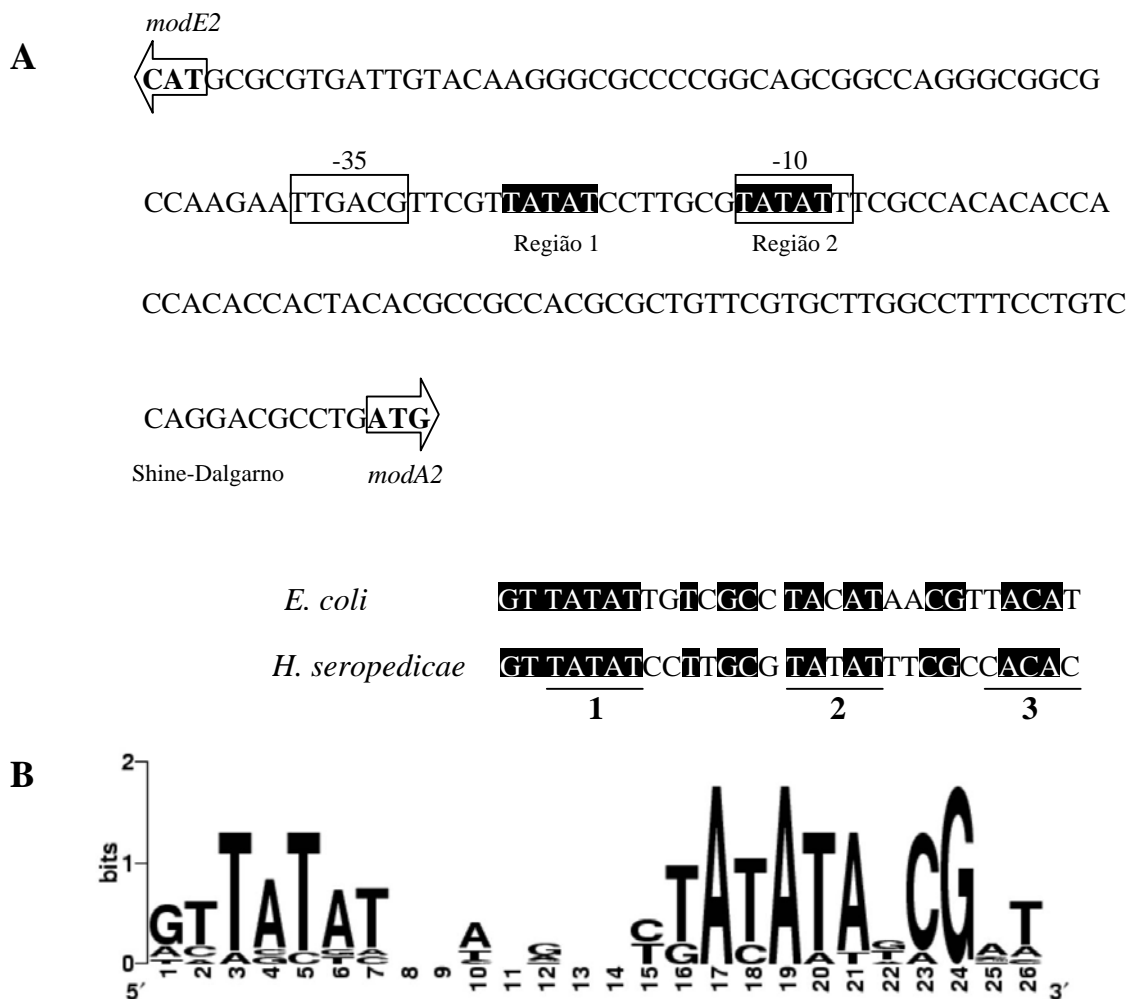
4.7.1 Análise da Região Promotora do Gene *modA2*

Os ensaios de ligação das proteínas His-ModE1 e His-ModE2 foram realizados utilizando um fragmento de aproximadamente 350 pb da região promotora do gene *modA2* de *H. seropedicae* (Figura 25A). Esta região contém uma seqüência consenso para ligação do complexo ModE-molibdato. Experimentos de *footprinting* com DNase I da região promotora de *modA* de *E. coli* mostraram que ModE protege três seqüências pentaméricas, TAYAT (Y = pirimidina). A primeira e a segunda são separadas por 7 nucleotídeos e a terceira é separada da segunda por 5 nucleotídeos; a última não é essencial para ligação de ModE (Figuras 2 e 5) (McNICHOLAS, RECH e GUNSALUS, 1997; GRUNDEN et al., 1999; ANDERSON et al., 1997; STUDHOLME e PAU, 2003).

A seqüência a montante dos genes *modA2B2C2* foi alinhada com a região promotora dos genes *mod* de outros organismos usando uma matriz de peso dependente da posição da base (SCHENEIDER e STEPHENS, 1990; CROOKS et al., 2004) (Figura 25B). Um alto grau de conservação foi observado na seqüência palindrômica (TATAT-N₇-TATAT), indicando que esta região pode ser uma

provável seqüência alvo para ligação das proteínas ModE1 e/ou ModE2 em *H. seropedicae*. Para a geração da representação gráfica foram alinhadas as seqüências a montante dos genes *modA*, *moaA* e *dmsA* de *E. coli*; *mopA* e *anfA* de *R. capsulatus*; *modE*, *modG*, *anfA* e *vnfA* de *A. vinelandii*, além da região a montante do gene *modA2* de *H. seropedicae* (Figura 25B).

FIGURA 25 - SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO INTERGÊNICA ENTRE *modA2B2C2* E *modE2* DE *H. seropedicae*



(A) Sequência da região entre os genes *modE2* e *modA2* de *H. seropedicae*. Na figura são indicados as prováveis regiões promotoras (-10/-35), as regiões consenso para ligação de ModE-molibdato (regiões 1 e 2), e o sítio para ligação de ribossomo (Shine-Dalgarno). Abaixo é mostrada uma comparação entre o sítio de ligação de ModE na região promotora de *modA* de *E. coli* com a mesma região de *H. seropedicae*. As bases dentro das caixas pretas são idênticas em ambas as seqüências.

(B) Frequência de bases no sítio de ligação de ModE-molibdato gerado a partir do alinhamento dos sítios de ligação a ModE da região promotora de alguns genes gerado pelo programa WebLogo (CROOKS et al., 2004)

4.8 ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 À DNA

A similaridade da seqüência de DNA da região promotora de *modA2* à seqüência consenso de ligação de ModE não é suficiente para demonstrar a presença de um sítio de ligação biologicamente significativo. Assim, experimentos de mobilidade em gel do complexo His-ModE1- e His-ModE2-DNA foram realizados para determinar a capacidade destas proteínas ligarem à região promotora de *modA2* em *H. seropedicae*.

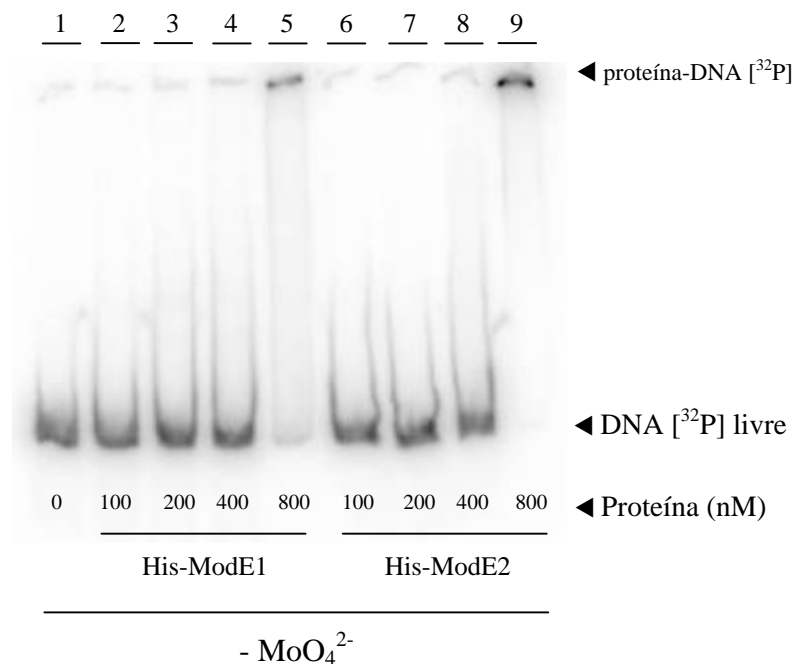
Em *E. coli*, a proteína ModE requer molibdato ou tungstato para ligar com alta afinidade à região promotora de *modABC* (ANDERSON et al., 1997). As proteínas His-ModE1 e His-ModE2 de *H. seropedicae* ligaram à região promotora de *modA2*, revelado pelo decréscimo da taxa de migração do fragmento de DNA de aproximadamente 350 pb marcado com [³²P] (Figuras 26 e 27). Todos os ensaios foram realizados na presença de DNA heterólogo de arenque não marcado (3 ng/uL). A quantidade de complexo formado foi dependente da concentração de proteína. Assumindo His-ModE1 e His-ModE2 como dímero em solução, 600 nM das proteínas purificadas foram capazes de ligar a 100% do DNA nos sistemas.

A ligação ao DNA de ambas as proteínas ocorreu independentemente da adição de molibdato. A insensibilidade à adição de molibdato no sistema pode sugerir que traços de molibdato presentes nos reagentes utilizados na purificação das proteínas sejam suficientes para saturar e ativar a ModE1 de *H. seropedicae*.

A proteína His-ModE2 também foi capaz de ligar à região promotora de *modA2* de maneira independente da adição de molibdato. Estes resultados estão de acordo com a estrutura predita da proteína ModE2 de *H. seropedicae* que contém somente o domínio hélice-volta-hélice (HTH) na região N-terminal, mas não o domínio DiMop de ligação a molibdato, que foi observado apenas na proteína ModE1 de *H. seropedicae*.

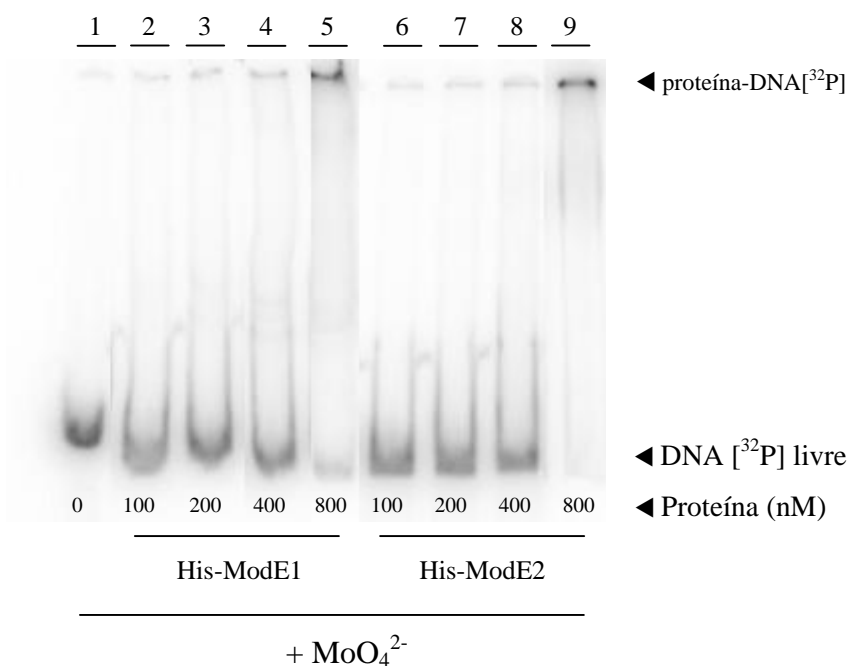
A especificidade da ligação das proteínas foi testada com um ensaio de competição com o mesmo fragmento de DNA de 350 pb não marcado (DNA homólogo frio) (Figuras 28 e 29). A análise densitométrica mostrou a dissociação dos complexos His-ModE1- e His-ModE2-DNA marcado na presença de 100 nM (excesso de 20 vezes) e 50 nM (excesso de 10 vezes) de fragmento de DNA não marcado, respectivamente.

FIGURA 26 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 NA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO À REGIÃO PROMOTORA DE *modA2* DE *H. seropedicae* NA AUSÊNCIA DE MOLIBDATO



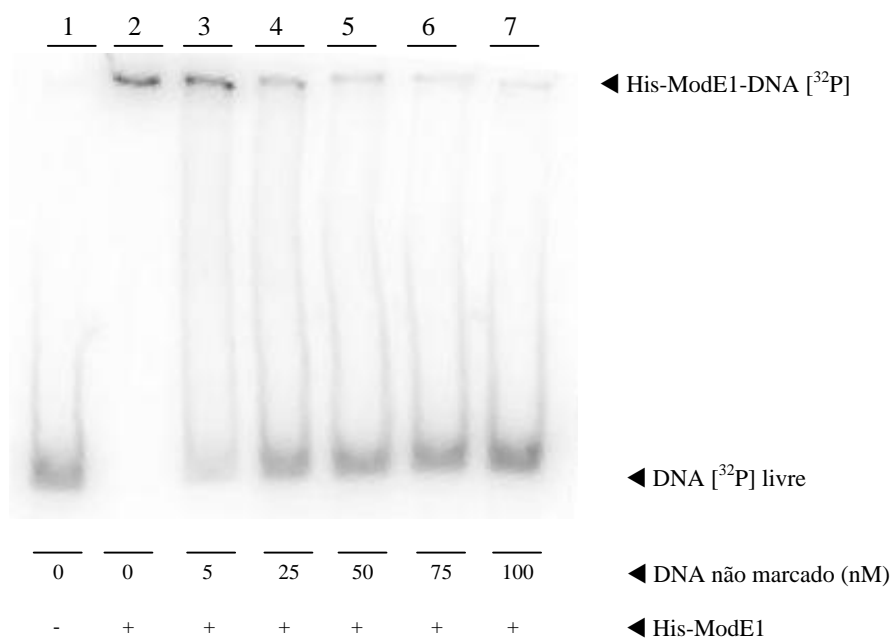
O ensaio de ligação foi feito usando 5 nM de um fragmento de DNA marcado com [³²P] de 350 pb contendo a região promotora de *modA2* de *H. seropedicae*. As concentrações das proteínas His-ModE1 e His-ModE2 utilizadas nos sistemas, o complexo proteína-DNA [³²P] formado e DNA livre estão indicados na figura. As reações de ligação foram aplicadas em gel de poliacrilamida 4% em TBE 1×. Estes géis foram secos e visualizados em PhosphorImager StormTM (GE Healthcare).

FIGURA 27 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS His-ModE1 E His-ModE2 NA ATIVIDADE DE LIGAÇÃO À REGIÃO PROMOTORA DE *modA2* DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE MOLIBDATO



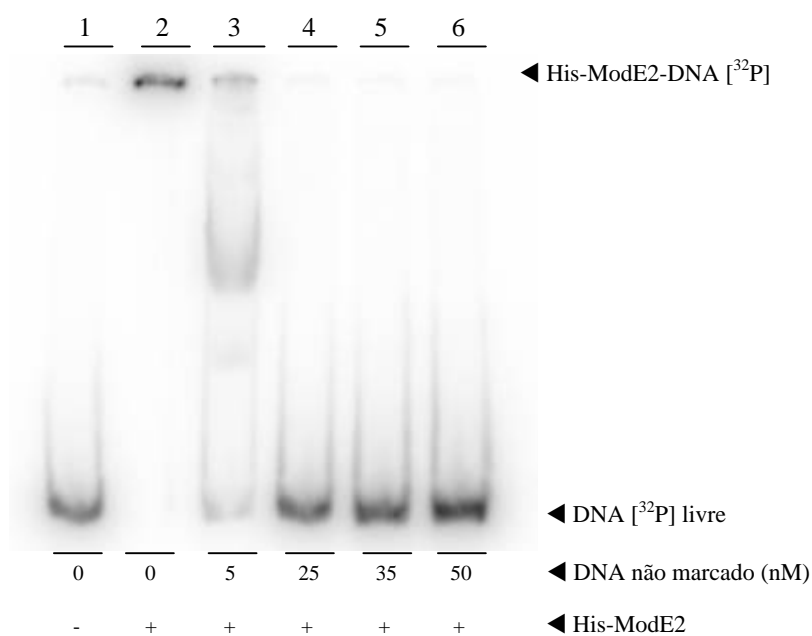
O ensaio de ligação foi feito usando 5 nM de um fragmento de DNA de 350 pb contendo a região promotora de *modA2* de *H. seropedicae* na presença de NaMoO₄.2H₂O 1 mM. As concentrações das proteínas His-ModE1 e His-ModE2 utilizadas nos sistemas, o complexo proteína-DNA[³²P] formado e DNA[³²P] livre estão indicados na figura. As reações de ligação foram aplicadas em gel de poliacrilamida 4% em TBE 1×. Estes géis foram secos e visualizados em PhosphorImager StormTM (GE Healthcare).

FIGURA 28 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS DE DNA DA REGIÃO PROMOTORA DE *modA2* MARCADO COM [32 P] E NÃO-MARCADO PELA LIGAÇÃO A His-ModE1



O ensaios foram feitos usando 600nM de His-ModE1 e 5 nM de DNA marcado [32 P]. As concentrações de DNA não-marcado adicionadas aos sistemas, o complexo His-ModE1-DNA [32 P] formado e o DNA [32 P] livre estão indicados na figura. As reações de ligação foram aplicadas em gel de poliacrilamida 4% em TBE 1 \times . Estes géis foram secos e visualizados em PhosphorImager StormTM (GE Healthcare).

FIGURA 29 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO ENTRE OS FRAGMENTOS DE DNA DA REGIÃO PROMOTORA DE *modA2* MARCADO COM [32 P] E NÃO-MARCADO PELA LIGAÇÃO A His-ModE2



O ensaios foram feitos usando 600nM de His-ModE2 e 5 nM de DNA marcado [32 P]. As concentrações de DNA não-marcado adicionado aos sistemas, o complexo His-ModE2-DNA [32 P] e DNA [32 P] livre estão indicados na figura. As reações de ligação foram aplicadas em gel de acrilamida 4% em TBE 1 \times . Estes géis foram secos e visualizados em PhosphorImager StormTM (GE Healthcare).

Os resultados apresentados mostraram que as proteínas His-ModE1 e His-ModE2 de *H. seropedicae* ligaram à região promotora do gene *modA2*. Esta região possui uma sequência consenso (TATAT-N₇-TATAT) de ligação de proteínas ModE. Ambas as proteínas foram capazes de ligar a esta região com a mesma especificidade, porém a ligação foi independente da presença de molibdato na reação.

Como demonstrado em *E. coli*, traços de molibdato são suficientes para aumentar a afinidade de ModE ao DNA alvo e reprimir a transcrição dos genes *modABC* (McNICHOLAS, RECH e GUNSALUS, 1997; GRUNDEN et al., 1999; HALL et al., 1999; SCHÜTTELKOPF, BOXER e HUNTER, 2003).

Em *H. seropedicae*, a insensibilidade com relação à presença de molibdato nos ensaios *in vitro* pode ter ocorrido devido a traços de molibdato presente nos reagentes utilizados na purificação e nos sistemas de reação, sendo aparentemente suficientes para não resultar em diferenças significativas no perfil de ligação. Ou ainda, o protocolo de purificação da proteína His-ModE1 envolveu etapas de desnaturação (uréia 8 mol/L) para solubilização dos corpos de inclusão e posterior renaturação, podendo resultar em alguma variação estrutural do domínio C-terminal levando à inativação do sítio de ligação a MoO₄²⁻ renaturado. Neste caso, esta eventual mudança conformacional não foi suficiente para comprometer a capacidade de interação com DNA, observada nos ensaios.

Os resultados apresentados sugerem que estas proteínas podem estar envolvidas na regulação da transcrição dos genes *modA2B2C2* em *H. seropedicae*, porém não refletem a condição fisiológica que permite o balanço entre os níveis intracelulares de molibdato e a síntese do transportador. Estudos adicionais envolvendo a caracterização de mutantes *modE1* e *modE2* contribuirão na determinação de seus papéis fisiológicos na regulação da captação de molibdato em *H. seropedicae*.

5 CONCLUSÕES

1. O gene *fdxA* é expresso em condições de fixação de nitrogênio;
2. A região *nifX-modA1* de *H. seropedicae* não possui promotor funcional em condições de fixação de nitrogênio;
3. O produto do gene *fdxA* é importante para a fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*, apresentando uma redução de 75% na redução de acetileno quando mutagenizado com um cassete *lacZ-Km*;
5. O produto do gene *fdxA* não está envolvido no processo de inibição reversível da nitrogenase em resposta a adição de íons amônio;
7. A expressão do gene *modB2* é regulada pela presença de molibdato no meio de cultura;
8. Mutação no gene *modB2* não afeta a atividade da nitrogenase mesmo em condições limitantes de molibdato;
9. A proteína His-ModE1 de *H. seropedicae* super-expressa em *E. coli* é insolúvel. Esta proteína foi isolada como corpos de inclusão, solubilizada com uréia 8 mol/L, renaturada e purificada em coluna de afinidade, obtendo-se uma forma solúvel da proteína com pureza de 98,1%.
10. A proteína His-ModE2 é solúvel quando expressa em *E. coli* e foi purificada por cromatografia de afinidade com pureza de 98,2%.

11. As proteínas His-ModE1 e His-ModE2 foram capazes de ligar *in vitro* à região promotora do operon *modA2B2C2* de *H. seropedicae*, independentemente da presença de molibdato.

12. Mutantes nos genes *modE1* e *modE2* contribuirão para a determinação de suas respectivas funções no processo de regulação do transporte de molibdato em *H. seropedicae*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDERSON, L.A.; McNAIRN, E.; LEUBKE, T.; PAU, R.N.; BOXER, D.H. ModE-dependent regulation of the molybdenum cofactor operon *moa* in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 24, p. 7035-7043, 2000.

ANDERSON, L.A.; PALMER, T.; PRICE, N.C.; BORNEMANN, S.; BOXER, D.H.; PAU, R.N. Characterisation of the molybdenum-responsive ModE regulatory protein and its binding to the promoter region of the *modABCD* (molybdenum transport) operon of *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, v. 246, p. 119-126, 1997.

BALDANI, J.I, BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. no., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BAUR, W. **Acta Crystallogr.**, v. 17, p. 1361-1369, 1964.

BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BENNION, B.J.; DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 9, p. 5142-5147, 2003.

BOHLOOL, B.B.; LADHA, J.K.; GARRITY, D.P.; GEORGE, T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant and Soil**, v. 141, p. 1-11, 1992.

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

BRUSCHI, M.; GUERLESQUIN, F. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 155-176, 1988.

CAPONE, D.G. Marine nitrogen fixation: what's the fuss? **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 341-348, 2001.

CORBIN, D.; BARRAN, L.; DITTA, G.S. Organization and expression of *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation genes. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 80, p. 3005-3009, 1983.

CORCUERA, L.; BASTIDAS, G.; DUBOURDIEU, M. Molybdenum uptake in *Escherichia coli* K12. **J. Gen. Microbiol.**, v. 193, n. 8, p. 1869-1875, 1993.

COTTER, P.A.; GUNSALUS, R.P. Oxygen, nitrate, and molybdenum regulation of *dmsABC* gene expression in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 7, p. 3817-3823, 1989.

CROOKS, G.E.; HON, G.; CHANDONIA, J.M.; BRENNER, S.E. WebLogo: A sequence logo generator. **Genome Res.**, v. 14, p. 1188-1190, 2004.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, I.J.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus (L) Merrill*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n.5, p.2375-2379, 2001

DAVIDSON, A.L., CHEN, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v.73, p.241-268, 2004.

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

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

DEISTUNG, J.; CANNON, F.C.; CANNON, M.C.; HILL, S.; THORNELEY, R.N.F. Electron transfer to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem. J.** v. 231, p. 743-753, 1985.

DEISTUNG, J.; THORNELEY, N.F. Electron transfer to nitrogenase. **Biochem. J.**, v. 239, p. 69-75, 1986.

DELARBRE, L.; STEVENSON, C.E.M.; WHITE, D.J.; MITCHENALL, L.A.; PAU, R.N.; LAWSON, D.M. Two crystal structures of the cytoplasmic molybdate-binding protein ModG suggest a novel cooperative binding mechanism and provide insights into ligand-binding specificity. **J. Mol. Biol.**, v. 308, p. 1063-1079, 2001.

DELGADO, M.J.; TRESIERRA-AYALA, A.; TALBI, C.; BEDMAR, E.J. Functional characterization of the *Bradyrhizobium japonicum modA* and *modB* genes involved in molybdenum transport. **Microbiol.**, v. 152, p. 199-207, 2006.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations of *Clostridium pasteurianum*. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 127, p. 285-294, 1966.

EADY, R.R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 3013-3030, 1996.

EBELING, S.; NOTI, J.D.; HENNECKE, H. Identification of a new *Bradyrhizobium japonicum* gene (*frxA*) encoding a ferredoxin-like protein. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 4, p. 1999-2001, 1988.

EDGREN, T.; NORDLUND, S. Electron transport to nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum*: identification of a new *fdxN* gene encoding the primary electron donor to nitrogenase. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 245, n. 2, p. 345-51, 2005.

EDGREN, T.; NORDLUND, S. Two pathways of electron transport to nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum*: the major pathway is dependent on the *fix* gene products. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 260, n. 1, p. 30-5, 2006.

EGENER, T.; MARTIN, D.E.; SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. Role of the ferredoxin gene cotranscribed with the *nifHDK* operon in N₂ fixation and nitrogenase "switch-off" of *Azoarcus* sp. strain BH72. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 12, p. 3752-3760, 2001.

EINSLE, O.; TEZCAN, F.A.; ANDRADE, S.L.A.; SCHMID, B.; YOSHIDA, M.; HOWARD, J.B.; REES, D.C. Nitrogenase MoFe protein at 1.16 angstrom resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. **Science**, v. 297, p. 1696-1700, 2002.

FISCHER, H.M.; HENNECKE, H. Linkage map of the *Rhizobium japonicum nifH* and *nifDK* operons encoding the polypeptides of the nitrogenase enzyme complex. **Mol. Gen. Genet.**, v. 196, p. 537-540, 1984.

FRAZZON, J.; SCHRANK, I.S. Sequencing and complementation analysis of the *nifUSV* genes from *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 159, p. 151-158, 1998.

FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 6, p. 3168-3175, 1989.

GALIMAND, M.; PERROUD, B.; DELORME, F.; PAQUELIN, A.; VIEILLE, C.; BOZOUKLIAN, H.; ELMERICH, C. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifUS* and *fixABC* in *Azospirillum brasilense* Sp7. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, p. 1-13, 1989.

GATEHOUSE, B.M.; LEVERETT, P. Crystal structure of potassium molybdate, K_2MoO_4 . **J. Chem. Soc. A**, p. 849-854, 1969.

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

GOTTFERT, M.; ROTH LISBERGER, S.; KUNDIG, C.; BECK, C.; MARTY, R. and HENNECKE, H. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 4, p. 1405-1412, 2001.

GOURLEY, D.G.; SCHÜTTELKOPF, A.W.; ANDERSON, L.A.; PRICE, N.C.; BOXER, D.H.; HUNTER, W.N. Oxyanion binding alters conformation and quaternary structure of the C-terminal domain of the transcriptional regulator ModE. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 23, p. 20641-20647, 2001.

GRANT, S.; JESSE, J.; BLOOM, F.; HANAHAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNA into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 4645-4649, 1990.

GRUNDEN, A.M.; RAY, R.M.; ROSENTEL, J.K.; HEALY, F.G.; SHANMUGAM, K.T. Repression of the *Escherichia coli modABCD* (molybdate transport) operon by ModE. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 3, p. 735-744, 1996

GRUNDEN, A.M.; SELF, W.T.; VILLAIN, M.; BLALOCK, J.E.; SHANMUGAM, K.T. An analysis of the binding of repressor protein ModE to *modABCD* (molybdate transport) operator/promoter DNA of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 34, p. 24308-24315, 1999.

GRUNDEN, A.M.; SHANMUGAM, K.T. Molybdate transport and regulation in bacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 168, n. 5, p. 345-354, 1997.

HAAKER, H.; KLUGKIST, J. The bioenergetics of electron transport to nitrogenase. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 46, p. 57-71, 1987.

HALL, D.R.; GOURLEY, D.G.; LEONARD, G.A.; DUKE, E.M.H.; ANDERSON, L.A.; BOXER, D.H.; HUNTER, W.N. The high-resolution crystal structure of the molybdate-dependent transcriptional regulator (ModE) from *Escherichia coli*: a novel combination of domain folds. **EMBO J.**, v. 18, n. 6, p. 1435-1446, 1999.

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v.166, p.557, 1983.

HAUSER, F.; PESSI, G.; FRIBERG, M.; WEBER, C.; RUSCA, N.; LINDEMANN, A.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H. Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA+sigma(54) regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. **Mol Genet Genomics**, v. 278, n. 3, p. 255-271, 2007.

HILL, S.; KAVANAGH, E.P. Roles of *nifF* and *nifJ* gene products in electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 141, n. 2, p. 470-475, 1980.

HILLE, R. Molybdenum and tungsten in biology. **TRENDS in Bioch. Sci.**, v. 27, n. 7, p. 360-367, 2002.

HILLE, R. The mononuclear molybdenum enzymes. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 2757-2816, 1996.

HINNEMANN, B.; NORSKOV, J.K. Modeling a central ligand in the nitrogenase FeMo cofactor. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 1466-1467, 2003.

HIROKAWA, T.; BOON-CHIENG, S.; MITAKU, S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, v. 14, p. 378-379, 1998.

HU, Y.; RECH, S.; GUNSALUS, R.P.; REES, D.C. Crystal structure of the molybdate binding protein ModA. **Nat. Struct. Biol.**, v. 4, n. 9, p. 703-707, 1997.

HUERGO, L.F.; SOUZA, E.M.; ARAUJO, M.S.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; STEFFENS, M.B.R.; MERRICK, M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. **Mol. Microbiol.**, v. 59, n. 1, p. 326-337, 2006.

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

INGLEDEW, W.J.; POOLE, R.K. The respiratory chains of *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, v. 48, n. 3, p. 222-271, 1984.

JACOBSON, M.R.; BRIGLE, K.E.; BENNETT, L.T.; SETTERQUIST, R.A.; WILSON, M.S.; CASH, V.L.; BEYNON, J.L.; NEWTON, W.E.; DEAN, D.R. Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 2, p. 1017-1027, 1989.

JOERGER, R.D.; BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *nifB-nifQ* region from *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 4, p. 1475-1487, 1988.

JOERGER, R.D.; LOVELESS, T.M.; PAU, R.N.; MITCHENALL, L.A.; SIMON, B.H.; BISHOP, P.E. Nucleotide sequences and mutational analysis of the structural genes for nitrogenase 2 of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 6, p. 3400-3408, 1990.

JOUANNEAU, Y.; MEYER, C.; NAUD, I.; KLIPP, W. Characterization of an *fdxN* mutant of *Rhodobacter capsulatus* indicates that ferredoxin I serves as electron donor to nitrogenase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1232, n. 1-2, p. 33-42, 1995.

JOUANNEAU, Y.; ROBY, C.; MEYER, C.M.; VIGNAIS, P.M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Rhodobacter capsulatus*. **Biochemistry**, v. 28, p. 6524-6530, 1989.

KIM, J.; REES, D.C. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. **Science**, v. 257, p. 1677-1682, 1992.

KLASSEN, G. **Análise genética e funcional dos genes *nifENXorf1orf2*, *nifQmodABCfixXC* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2000. 148 f. Tese de doutorado em Ciências Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 887-891, 1997.

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

KOKOTEK, W.; LOTZ, W. Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. **Gene**, v. 84, n. 2, p. 467-471, 1989.

KOSTER, A.S.; KOOLS, F.X.N.M.; RIECK, G.D. The crystal structure of potassium tungstate, K_2WO_4 . **Acta Crystallogr.**, B25, p. 1704-1708, 1969.

KROL, A.J.M.; HONTELEZ, J.G.J.; ROOZENDAAL, B.; KAMMEN, A.V. On the operon structure of the nitrogenase genes of *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter vinelandii*. **Nucl. Ac. Res.**, v. 10, p. 4147-4157, 1982.

KUTSCHE, M.; LEIMKÜHLER, S.; ANGERMÜLLER, S.; KLIPP, W. Promoters controlling expression of the alternative nitrogenase and the molybdenum uptake system in *Rhodobacter capsulatus* are activated by NtrC, independent σ^{54} , and repressed by molybdenum. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 7, p. 2010-2017, 1996.

LAEMMLI, E.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAWSON, D.M.; WILLIAMS, C.M.E.; MITCHENALL, L.A.; PAU, R.N. Ligand size is a major determinant of specificity in periplasmic oxyanion-binding proteins: the 1.2 Å resolution structure of *Azotobacter vinelandii*. **Structure**, v. 6, n. 12, p. 1529-1539, 1998

LEE, S.; RETH, A.; MELETZUS, D.; SEVILLA, M.; KENNEDY, C. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix*, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 24, p. 7088-7091, 2000.

LETUNIC, I.; COPLEY, R.R.; PILS, B.; PINKERT, S.; SCHULTZ, J.; BORK, P. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. **Nucleic Acid Res.**, v. 34, p. 257-260, 2006.

LINTON, K.J.; HIGGINS, C.F. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 5-13, 1998.

LOCHER, K.P. Structure and mechanism of ABC transporters. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 14, p. 426-431, 2004.

LUQUE, F.; MITCHENALL, L.A.; CHAPMAN, M.; CHRISTINE, R.; PAU, R.N. Characterization of genes involved in molybdenum transport in *Azotobacter vinelandii*. **Mol. Microbiol.**, v. 7, n. 3, p. 447-459, 1993.

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

MAUPIN-FURLOW, J.A.; ROSENTEL, J.K.; LEE, J.H.; DEPPENMEIER, U.; GUNSALUS, R.P.; SHANMUGAM, K.T. Genetic analysis of the *modABCD* (molybdate transport) operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 17, p. 4851-4856, 1995.

McNICHOLAS, P.M.; CHIANG, R.C.; GUNSALUS, R.P. Anaerobic regulation of the *Escherichia coli* *dmsABC* operon requires the molybdate-responsive regulator ModE. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 197-208, 1998.

McNICHOLAS, P.M.; CHIANG, R.C.; GUNSALUS, R.P. The *Escherichia coli* *modE* gene: effect of *modE* mutations on molybdate dependent *modA* expression. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 145, p. 117-123, 1996.

McNICHOLAS, P.M.; GUNSALUS, R.P. The molybdate-responsive *Escherichia coli* ModE transcriptional regulator coordinates periplasmic nitrate reductase (*napFDAGHBC*) operon expression with nitrate and molybdate availability. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 12, p. 3253-3259, 2002.

McNICHOLAS, P.M.; RECH, S.A.; GUNSALUS, R.P. Characterization of the ModE DNA-binding sites in the control regions of *modABCD* and *moaABCDE* of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 3, p. 515-524, 1997.

MENARD, A.; MONNEZ, C.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; SEGONDS, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; LIPUMA, J.J.; CHABANON, G.; COURNOYER, B. Selection of nitrogen-fixing deficient *Burkholderia vietnamiensis* strains by cystic fibrosis patients: involvement of *nif* gene deletions and auxotrophic mutations. **Environ Microbiol.**, v. 9, n. 5, p. 1176-85, 2007.

MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes. In: PALACIOS, R.; MARA, J. E NEWTON, W.E. (eds) **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Netherlands: Nijhoff Publishers, p. 1-12, 1992.

MILLER, J.H. A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 456 p., 1992.

MILLER, J.H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972.

MORENO-VIVIAN, C.; HENNECKE, S.; PÜHLER, A.; KLIPP, W. Open reading frame 5 (ORF5), encoding a ferredoxinlike protein, and *nifQ* are cotranscribed with

nifE, *nifN*, *niJX*, and ORF4 in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 5, p. 2591-2598, 1989.

MOUNCEY, N.J.; MITCHENALL, L.A.; PAU, R.N. The *modE* gene product mediates molybdenum-dependent expression of genes for the high-affinity molybdate transport and *modG* in *Azotobacter vinelandii*. **Microbiol.**, v. 142, p. 1997-2004, 1996.

MULLIGANN, M.E.; BUIKEMA, W.J.; HASELKORN, R. Bacterial-type ferredoxin genes in the nitrogen fixation regions of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 4406-4410, 1988.

MURZIN, A.G. OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. **EMBO J.**, v. 12, p. 861-867, 1993.

NEUBAUER, H.; PANTEL, I.; LINDGREN, P.E.; GOTZ, F. Characterization of the molybdate transport system ModABC of *Staphylococcus carnosus*. **Arch Microbiol.**, v. 172, n. 2, p. 109-115, 1999.

NIKAIDO, H.; HALL, J.A. Overview of bacterial ABC transporters. **Meth. Enzimol.**, v. 292, p. 3-20, 1998.

NOINDORF, L.; REGO, F.G.; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.;

CHUBATSU, L.S; Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch Microbiol.**, v.185, p.55-62, 2006

PASSAGLIA, L.M.P.; NUNES, C.P.; ZAHA, A.; SCHRANK, I.S. The *nifHDK* operon in the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises genes H,D,K, an 353 bp orf and gene Y. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 649-675, 1991.

PAU, R.N.; MITCHENALL, L.A.; ROBSON, R.L. Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 1, p. 124-129, 1989.

PEDROSA, F.O.; TEIXEIRA, K.R.S.; MACHADO, I.M.P.; STEFFENS, M.B.R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E.M.; MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; ISHIDA, M.L.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, n. 5/6, p. 843-846, 1997.

PÉREZ-RUEDA, E.; COLLADO-VIDES, J. Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in Archaea and Bacteria. **J. Mol. Evol.**, v. 53, p. 172-179, 2001.

PIERRARD, J.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: existence of two independent regulatory effects of ammonium. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 1358-136, 1993.

POPE, M.R.; MURELL, S.A.; LUDDEN, P.W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenine

diphosphoribosylation of a specific arginine residue. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 82, p. 3173-3177, 1985.

POSTGATE, J. Nitrogenase. **Biologist.**, v. 32, p. 43-48, 1985.

POTRICH, D.P.; BRESSEL, T.A.; SCHRANK, I.S.; PASSAGLIA, L.M. Sequencing and promoter analysis of the *nifENXorf3orf5fdxAnifQ* operon from *Azospirillum brasilense*. Sp7. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 11, p. 1379-95, 2001

RECH, S.; DEPPENMEIER, U.; GUNSALUS, R.P. Regulation of the molybdate transport operon, *modABCD*, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 4, p. 1023-1029, 1995.

RECH, S.; WOLIN, C.; GUNSALUS, R.P. Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 5, p. 2557-2562, 1996.

REES, D.C.; HOWARD, J.B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 4, p. 559-566, 2000.

REGO, F.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; WASSEM, R., STEFFENS, M.B.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. The expression of *nifB* gene from *Herbaspirillum seropedicae* is dependent upon the NifA and RpoN proteins. **Can J Microbiol.**, v. 52, n. 12, p. 1199-207, 2006.

RILEY, M.; ABE, T.; ARNAUD, M.B.; BERLYN, M.K.B.; BLATTNER, F.R.; CHAUDHURI, R.R.; GLASNER, J.D.; HORIUCHI, T.; KESELER, I.M.;

KOSUGE, T.; MORI, H.; PERNA, N.T.; PLUNKETT, III, G.; RUDD, K.E.; SERRES, M.H.; THOMAS, G.H.; THOMSON, N.R.; WISHART, D.; WANNER, B.L. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot—2005. **Nucl. Ac. Res.**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2006.

ROSENTEL, J.K.; HEALY, F.; MAUPIN-FURLOW, J.A.; LEE, J.H.; SHANMUGAM, K.T. Molybdate and regulation of *mod* (molybdate transport), *fdhF*, and *hyc* (formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 17, p. 4857-4864, 1995.

SAEKI, K.; SUETSUGU, Y.; TOKUDA, K.; MIYATAKE, Y.; YOUNG, D.A.; MARRS, B.L.; MATSUBARA, H. Genetic analysis of functional differences among distinct ferredoxins in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 20, p. 12889-12895, 1991.

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

SCHENEIDER, K.A.; MÜLLER, U.; JOHANNES, K.U.; DIEMANNE, E.; KOTTMANN, J. Selective removal of molybdenum traces from growth media of N₂-fixing bacteria. **Anal. Biochem.**, v. 193, p. 292-298, 1991.

SCHENEIDER, T.D.; STEPHENS, R.M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. **Nucl. Ac. Res.**, v. 18, p. 6097-6100, 1990.

SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R.H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 58, p. 213-216, 1967.

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

SCHÜTTELKOPF, A.W.; BOXER, D.H.; HUNTER, W.H. Crystal structure of activated ModE reveals conformational changes involving both oxyanion and DNA-binding domains. **J. Mol. Biol.**, v. 326, p. 761-767, 2003.

SCHWARZ, G.; MENDEL, R.R. Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 623-647, 2006.

SCHWARZ, G. Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. **Cell Mol. Life Sci.**, v.62, p.2792-2810, 2005.

SELF, W.T.; GRUNDEN, A.M.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K.T. Molybdate transport. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 311-321, 2001.

SELF, W.T., GRUNDEN, A.M., HASONA, A., SHANMUGAM, K.T. Transcriptional regulation of molybdoenzyme synthesis in *Escherichia coli* in response to molybdenum: ModE-molybdate, a repressor of the *modABC* (molybdate transport) operon is a secondary transcriptional activator for the *hyc* and *nar* operons. **Microbiol.**, v. 145, p.41-55, 1999.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/Technology**, p. 784-791, 1983.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, p. 1095-1097, 1984.

SINGH, S.M.; PANDA, A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **J. Biosc. Bioeng.**, v. 99, p. 303-310, 2005.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v. 98, p. 503-517, 1975.

SOUZA, A.L.F. **Análise genética da região a jusante dos genes *nifHDKENXorf1orf2* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2003. 83 f. Dissertação de mestrado em Ciências Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade federal do Paraná.

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

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

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and

NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiol.**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. Promoters in the nodulation region of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Molec. Biol.**, v.9, p.27-39, 1987.

STUDHOLME, D.J.; PAU, R.N. A DNA element recognised by the molybdenum-responsive transcription factor ModE is conserved in Proteobacteria, green sulphur bacteria and Archaea. **BMC Microbiol.**, v. 3, p. 24, 2003.

TAO, H.; HASONA, A.; DO, P.M.; INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. Global gene expression analysis revealed an unsuspected *deo* operon under the control of molybdate sensor ModE protein, in *Escherichia coli*. **Arch. Microbiol.**, v. 184, n. 4, p. 225-233, 2005

THIEL, T.; PRATTE, B.; ZAHALAK, M. Transport of molybdate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC29413. **Arch. Microbiol.**, v. 179, p. 50-56, 2002.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

VOIGT, E. **Identificação e análise estrutural de genes a montante do gene *nifA* em *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2000. 74 f. Dissertação de mestrado e

Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WAGNER, U.G.; STUPPERICH, E.; KRATKY, C. Structure of the molybdate/tungstate binding protein Mop from *Sporomusa ovata*. **Structure**, v. 8, p. 1127-1136, 2000.

WANG, G., ANGERMÜLLER, S.; KLIPP, W. Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum-pterin-binding system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 10, p. 3031-3042, 1993.

WIETHAUS, J.; WIRSING, A.; NARBERHAUS, F.; MASEPOHL, B. Overlapping and specialized functions of the molybdenum-dependent regulators MopA and MopB in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 24, p. 8441-8451, 2006.

YAKUNIN, A.F.; HALLENBECK, P.C. AmtB is necessary for NH_4^+ -induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 15, p. 4081–4088, 2002.

YATES, M.G. Electron transport to nitrogenase in *Azotobacter chroococcum*: flavodoxin hydroquinone as an electron donor. **FEBS Lett.**, v. 27, n. 1, p. 63-67, 1972.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, in: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Eds.), Biological Nitrogen Fixation, Chapman & Hall, New York, 1992, 43-88.

ZAHALAK, M.; PRATTE, B.; WERTH, K.J.; THIEL, T. Molybdate transport and its effect on nitrogen utilization in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 539-549, 2004.