



CAROLINE YUKI NISHIKAWA

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA FORMA
N-TRUNCADA DA PROTEÍNA NIFA DE**

Azospirillum brasilense

CURITIBA
2010

CAROLINE YUKI NISHIKAWA

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA FORMA
N-TRUNCADA DA PROTEÍNA NIFA DE**

Azospirillum brasilense

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Leda Satie Chubatsu

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luíza Maria de Araújo

CURITIBA
2010

TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINE YUKI NISHIKAWA

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA FORMA N-TRUNCADA DA
PROTEÍNA NIFA DE *Azospirillum brasilense*

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Leda Satie Chubatsu (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof^a. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof^a. Dr^a. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Departamento de Patologia Médica – UFPR

Curitiba-PR, 12 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas orientadoras Prof^a. Dr^a. Leda Satie Chubatsu e Prof^a. Dr^a. Luíza Maria de Araújo pela paciente e atenciosa orientação durante esses dois anos de trabalho, sempre à disposição para discussões, conselhos ou mesmo eventuais conversas informais;

a todos os demais professores do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio: Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza, Prof^a. Dr^a. Liu Un Rigo, Prof^a. Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens, Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro, Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz, Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo, Prof^a. Dr^a. Roseli Wassem pelas ajudas prestadas durante esse trabalho direta ou indiretamente;

à Roseli Prado, ao Valter e à dona Julieta que estão constantemente ajudando a todos, indiscutivelmente, e também pelos momentos de descontração;

a todos os colegas do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio que ajudaram em dúvidas simples ou às vezes nem tão simples assim;

ao Marco Antônio Kadowaki pela paciência, ajuda e ensinamentos em alguns experimentos desse trabalho, ao Arnaldo pela ajuda e pelos conselhos e ao Marco Aurélio Oliveira, que prontamente respondeu-me algumas dúvidas mesmo estando longe;

aos amigos dos laboratórios 271 e 272: Kerly Laskoski, pela ajuda no início da minha chegada ao laboratório e sempre em experimentos e pela companhia, Maria Isabel Stets, pela constante e agradável companhia no laboratório, no lanche da tarde, pelas conversas e afins, Giovani Pisa e Lúcia Froufe pelos muitos momentos de descontração; obrigada também aos alunos de iniciação científica Patrícia Sotomaior, Felipe Bueno, Vanessa Chicora, Marcelo Scarduelli, Victor Souza, Lucas Falarz, Daniela Cordellini e Evandro Tirapelle pelas conversas informais e pelas ajudas muitas vezes prestadas;

à Viviane Martini, Sarah Thimóteo, Marina Kadowaki, Vânia Pankievicz Vivian Moure, Elizabeth Cunha e Juliana Osaki pelas ótimas companhias seja para discussões sobre experimentos seja para conversas jogadas fora;

aos colegas do mestrado da turma de 2008: Daiane, Diniara, Eduardo A., Eduardo B., Fernanda, Giovana, Gustavo, Kerly, Juliana, Juliane, Marina, Mônica, Nicole, Phelipe, Regina, Thiago, Vânia e Vinícius pelo companheirismo durante todo o semestre de disciplinas e pelos bons momentos nesses dois anos que se passaram;

ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica e à agência financiadora CAPES pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho e pelo suporte financeiro;

ao meu namorado Edmar Nagayama pela pessoa simples, carinhosa, companheira, prestativa e amorosa que é em minha vida, que consegue estar sempre presente mesmo estando ausente;

agradeço imensamente à minha família, meus pais Julio Nishikawa e Eni M. C. Nishikawa pelo apoio e amor incondicional em todas as etapas da minha vida, às minhas irmãs Camila e Carina pela companhia na vida estando perto ou longe e ao meu sobrinho Natan, que mesmo não entendendo o que acontece ao seu redor alegra nossas vidas.

Agradeço a Deus por nos proteger e pela vida.

NISHIKAWA, C. Y. **Expressão e caracterização de uma forma N-truncada da proteína NifA de *Azospirillum brasilense***. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brasil.

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma bactéria fixadora de nitrogênio que se associa com diversas plantas agrícolas de interesse comercial como o arroz, o milho e o trigo. É muito estudado por seu potencial como biofertilizante, podendo reduzir a utilização de fertilizantes químicos nitrogenados e conseqüentemente os danos ao meio ambiente, como a eutrofização de rios e a acidificação do solo. Neste microrganismo os genes responsáveis pela fixação de nitrogênio (genes *nif*) necessitam de uma proteína ativadora transcricional, a NifA. A proteína NifA tem sua atividade regulada pelos níveis de oxigênio e de íons NH_4^+ e possui três domínios funcionais. O domínio N-terminal é responsável pelo controle negativo dos níveis intracelulares de nitrogênio; o domínio central interage com o fator sigma-54 da RNA polimerase e possui um motivo de hidrólise de ATP e o domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice responsável pela ligação da proteína ao DNA. Esses domínios são interligados por regiões interdomínio QL (N-terminal e Central) e IDL (Central e C-terminal). Na extremidade final do domínio central e início do interdomínio IDL há um motivo conservado de resíduos de cisteínas provavelmente envolvidos na sensibilidade da proteína ao oxigênio. Neste trabalho a proteína NifA de *A. brasilense* foi expressa e purificada em uma forma N-truncada fusionada a uma cauda contendo resíduos de histidina e caracterizada em ensaios de ligação ao DNA *in vitro* e de ativação transcricional *in vivo*. A proteína recombinante His-NifA N-truncada purificada atingiu 80% de pureza com rendimento de 0,43mg de proteína por litro de cultura. A proteína purificada foi capaz de se ligar à região promotora do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Ensaios *in vivo* com a proteína NifA N-truncada contendo ou não cauda de histidina mostraram capacidade de ativar o promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae* a partir de uma fusão *nifH::lacZ* na ausência de oxigênio. Nossos resultados também indicaram que a NifA N-truncada de *A. brasilense* parece ser menos sensível ao oxigênio que a NifA N-truncada de *H. seropedicae*.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, *Azospirillum brasilense*, proteína NifA.

NISHIKAWA, C. Y. **Expressão e caracterização de uma forma N-truncada da proteína NifA de *Azospirillum brasilense***. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brasil.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a nitrogen-fixing bacterium which associates with important agricultural crops such as rice, wheat and maize. It can be used as a biofertilizer, replacing chemically produced nitrogen fertilizer. In this bacterium the expression of genes responsible for nitrogen fixation (*nif* genes) is dependent on the transcriptional activator NifA, the activity of which is controlled by both ammonium and oxygen. NifA contains three structural domains: the N-terminal domain is responsible for the negative control by fixed nitrogen; the central domain has the AAA motif involved in ATP hydrolysis and interacts with the RNA polymerase sigma-54 cofactor; the C-terminal domain contains a helix-turn-helix motif involved in DNA-binding. These domains are linked by the two interdomain regions: QL (N-terminal to central domain) and IDL (central to C-terminal domain). Between the central domain end and the IDL interdomain there is a cysteine-cysteine motif probably involved in the oxygen-sensitivity of NifA. In this work we have expressed and purified an N-truncated form of NifA fused to a histidine tag and assayed for DNA binding. Under our experimental conditions, we were able to obtain an 80% pure protein and a yield of 0,43mg protein per liter of culture. The purified protein bound to the *Herbaspirillum seropedicae nifB* promoter region. We also tested the transcriptional activation of the N-truncated NifA protein in vivo using a *nifH::lacZ* fusion. The N-truncated NifA, with or without a His-tag sequence activated transcription of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter in the absence of oxygen and showed no control by ammonium. Our results also suggest that the *A. brasilense* N-truncated NifA protein is less oxygen-sensitive than the *H. seropedicae* N-truncated NifA.

Key-words: Biological nitrogen fixation, *Azospirillum brasilense*, NifA protein.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Amp^R – Resistência a Ampicilina
ATP – Adenosina trifosfato
BSA – Albumina de soro bovino
Cm^R – Resistência a Cloranfenicol
DMSO – Dimetilssulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTP's – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
D.O. – Densidade ótica
DTT - Ditionitrito
EBP – *Enhancer binding protein*
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
IHF – *Integration Host Factor*
IPTG – β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
k Ω – Quilo Ohms
kDa – Quilo Daltons
Km^R – Resistência a Canamicina
ONPG – o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ORF – *Open Reading Frame*
pb – Pares de bases
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PEG – Polietileno glicol
PMSF – α -toluenosulfonil fluoreto
PVDF – Fluoreto de polivinilideno
RNA – Ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
Sm^R – Resistência a Estreptomicina
TEMED – N',N',N',N',tetrametil-etilenodiamina
Tris – Tris (hidroximetil)-aminometano
UAS – *Upstream Activation Sequence*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo estrutural esquemático da proteína NifA de <i>Azospirillum brasilense</i>	20
Figura 2 - Modelo esquemático do processo de ativação da transcrição a partir de promotor localizado a -24/-12 bases do início da transcrição.	22
Figura 3 - Modelo da regulação da atividade da proteína NifA em resposta a amônio e na presença da proteína PII.....	25
Figura 4 - Sequência do gene que codifica para os domínios central+C-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> (GenBank: X60714.1).....	46
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE1X dos produtos de amplificação do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> obtidos a diferentes temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.....	48
Figura 6 - Sistema de clonagem TA.	49
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE1X de DNA obtido de clones transformados e resistentes a Amp.	50
Figura 8 - Esquema do clone em pTZ57R/T digerido com a enzima EcoRI.	50
Figura 9 - Esquema do clone em pTZ57R/T digerido com a enzima PstI.	51
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE1X da análise da restrição dos clones.	52
Figura 11 - Modelo esquemático da região do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada que foi sequenciada.....	53
Figura 12 - Estratégia de clonagem do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada nos vetores de expressão pET28a e pT7-7.	54
Figura 13 - Estratégia de clonagem do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada nos vetores de expressão pDK5, pDK6 e pDK7.	55
Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% das frações protéicas obtidas durante a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Chelating Ni ²⁺ (GE Healthcare).	57
Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% das frações protéicas obtidas durante a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Heparin (GE Healthcare).	58

Figura 16 - Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	60
Figura 17 - Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> na presença de diferentes concentrações de DNA homólogo não marcado.....	61
Figura 18 - Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> na presença de diferentes concentrações de DNA de timo bovino.	62
Figura 19 - Esquema geral do ensaio de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada.....	65
Figura 20 - Ensaio de ativação transcricional <i>in vivo</i> de uma fusão <i>nifH::lacZ</i> presente no plasmídeo pRT22 pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNT7CCT.	67
Figura 21 - Curva de crescimento celular e de atividade β -galactosidase de células JM109 (DE3) transformadas com os plasmídeos pRT22 e pCNT7CCT na ausência de IPTG para verificar a presença de escape na expressão da proteína NifA N-truncada.....	68
Figura 22 - Ensaio de ativação transcricional <i>in vivo</i> pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNT7CCT na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir plasmídeo pLANTpET.....	69
Figura 23 - Ensaio de ativação transcricional <i>in vivo</i> pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNK6CCT na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir plasmídeo pCNK5NT.	70
Figura 24 - Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de células JM109 (DE3) contendo o plasmídeo pRT22 e expressando as proteínas NifA N-truncada e/ou o domínio N-terminal.....	71
Figura 25 - Ensaio de ativação transcricional <i>in vivo</i> pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNpETCCT (promotor T7) na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir plasmídeo pCNK5NT (promotor <i>tac</i>).	72
Figura 26 - Ensaio de ativação transcricional <i>in vivo</i> pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNK5CCT (promotor <i>tac</i>) na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir plasmídeo pLANTpET (promotor T7).	72

- Figura 27** - Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNK6CCT (promotor *tac*) na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir plasmídeo pCN18RNT (promotor *lac*)..... 73
- Figura 28** - Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de células JM109(DE3) contendo o plasmídeo pRT22 e expressando as proteínas NifA N-truncada e/ou o domínio N-terminal..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	27
Tabela 2 – Plasmídeos utilizados	27
Tabela 3 – Concentrações de antibióticos utilizadas	30
Tabela 4 – Tampões utilizados para purificação da proteína His-NifA N-truncada em coluna Hi-Trap Chelating Ni ²⁺	38
Tabela 5 – Tampões utilizados para purificação da proteína His-NifA N-truncada em coluna HiTrap Heparin	39
Tabela 6 – Tabela de purificação da proteína His-NifA N-truncada expressa em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Gênero <i>Azospirillum</i>	15
1.2	Fixação biológica de nitrogênio.....	15
1.3	Genes <i>nif</i>	17
1.4	Regulação transcricional da nitrogenase.....	18
1.4.1	Proteína NifA.....	18
1.4.1.1	Estrutura e função dos domínios da proteína NifA	19
1.4.2	Formação do complexo RNA polimerase - DNA e início da transcrição	20
1.5	Proteínas do tipo PII	22
2	OBJETIVO	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Bactérias e plasmídeos.....	27
3.2	Meios de cultura.....	29
3.3	Antibióticos.....	30
3.4	Amplificação do DNA por PCR	30
3.5	Eletroforese de DNA	31
3.6	Sequenciamento de DNA.....	32
3.7	Purificação de plasmídeo	32
3.8	Purificação de DNA por eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão	33
3.9	Quantificação de DNA.....	33
3.9.1	Determinação espectrofotométrica da quantidade de DNA	33
3.9.2	Quantificação de DNA dupla-fita por fluorescência emitida por brometo de etídio.....	34

3.10	Clivagem de DNA com enzima de restrição.....	34
3.11	Ligação de DNA	35
3.12	Análise de plasmídeos recombinantes	35
3.13	Transformação bacteriana por eletroporação.....	35
3.13.1	Preparo de células eletrocompetentes.....	35
3.13.2	Eletroporação.....	36
3.14	Eletroforese em gel de poliacrilamida	36
3.14.1	Eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	36
3.14.2	Eletroforese sob condições não desnaturantes.....	37
3.15	Expressão da proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i>	37
3.16	Purificação da proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i>	38
3.16.1	Purificação em coluna HiTrap Chelating Ni ²⁺	38
3.16.2	Purificação em coluna HiTrap Heparin	39
3.17	Dosagem de proteínas	40
3.18	Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	40
3.18.1	Amplificação da região promotora do gene <i>nifB</i>	40
3.18.2	Ensaio de retardamento de banda em gel	41
3.19	Ensaio de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada.....	42
3.19.1	Determinação da atividade da β -galactosidase.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Amplificação e clonagem do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i>	44
4.2	Expressão e purificação da proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i>	56
4.3	Ensaio <i>in vitro</i> de atividade de ligação da proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> à região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	59
4.4	Ensaio de ativação transcricional <i>in vivo</i> pela NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i>	63

5 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICE	89
Apêndice A – Estratégia de clonagem do gene que codifica para o domínio N-terminal em vetores pDK5, pDK7 e pTZ18R.	90
ANEXOS	91
Anexo A – Vetor de clonagem pTZ57R/T (Fermentas).....	92
Anexo B – Vetor de expressão pET28a (Novagen)	93
Anexo C – Vetor de expressão pT7-7 (Tabor e Richardson, 1985)	94
Anexo D – Vetor de expressão pDK5 (Kleiner et al., 1988).....	95
Anexo E – Vetor de expressão pDK6 (Kleiner et al., 1988)	96
Anexo F – Vetor de expressão pDK7 (Kleiner et al., 1988)	97
Anexo G – Vetor de expressão pTZ18R (Mead; Szczena-skorupa e Kemper, 1986).....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem à classe das α -Proteobactérias (YOUNG et al, 1992) e são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico. Estas bactérias foram isoladas da rizosfera de plantas de diversas partes do mundo de climas temperado e tropical. Entre as plantas com as quais se associam estão o trigo, o milho, o arroz e a cana-de-açúcar, plantas de grande interesse comercial (DÖBEREINER; DAY, 1976). A maioria destas bactérias coloniza superficialmente as raízes das plantas, mas algumas espécies são capazes de se associar endofiticamente (PATRIQUIN; DÖBEREINER; JAIN, 1983).

Azospirillum é o gênero melhor caracterizado de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. Este efeito tem sido atribuído a diversos fatores, entre eles à fixação biológica de nitrogênio e à produção de hormônios promotores do crescimento para as plantas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Como este trabalho se relaciona à regulação do processo de fixação biológica de nitrogênio, apenas este fator será abordado nesta revisão bibliográfica.

Atualmente são descritas doze espécies pertencentes ao gênero *Azospirillum*: *A. brasilense*, *A. lipoferum* (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. irakense* (KHAMAS et al., 1989), *A. largimobile* (DEKHIL et al., 1997), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001) e *A. oryzae* (XIE; YOKOTA, 2005). *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZ; WESELOWSKI; LAZAROVITS, 2007a), *A. zea* (MEHNAZ; WESELOWSKI; LAZAROVITS, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008). Entre as várias espécies, *A. brasilense* e *A. lipoferum* são as melhor caracterizadas.

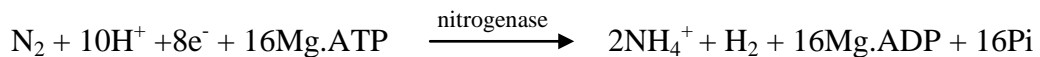
1.2 Fixação biológica de nitrogênio

A forma mais abundante do elemento nitrogênio, necessário para a síntese de inúmeras biomoléculas, é o gás dinitrogênio (N_2), que constitui aproximadamente 80% da atmosfera da Terra (POSTGATE, 1982). No entanto, o nitrogênio constitui um elemento

limitante para o desenvolvimento de microrganismos, plantas e animais, pois apenas alguns procariotos (diazotrofos) são capazes de converter o nitrogênio atmosférico em amônio, forma metabolicamente utilizável para a síntese de biomoléculas. Desta forma, os organismos incapazes de fixar nitrogênio atmosférico, acabam por utilizar o nitrogênio que foi fixado pelos diazotrofos (BURRIS, 1991).

A disponibilidade de nitrogênio fixado constitui um dos fatores limitantes para a produção agrícola, cuja demanda tem aumentado com o crescimento populacional (DIXON; KHAN, 2004). Os vegetais podem obter o elemento nitrogênio através de microrganismos diazotrofos ou através de fertilizantes nitrogenados. Estes, porém, constituem o mais caro dos fertilizantes agrícolas utilizados, além de causarem impactos ambientais indesejáveis, pois aproximadamente 50% do fertilizante aplicado são perdidos e carregados por ação de chuvas e erosão (PEDROSA, 1987). Dessa forma, a utilização de microrganismos diazotrofos na agricultura é de grande interesse econômico e ambiental.

O processo de fixação de nitrogênio é realizado pelo complexo enzimático chamado nitrogenase, que catalisa a redução do N_2 a NH_4^+ através da seguinte reação (POSTGATE, 1982):



O complexo da nitrogenase é formado por duas proteínas distintas: a dinitrogenase (também chamada de proteína Fe-Mo, codificada pelo gene *nifDK*), que contém o sítio catalítico da enzima responsável por reduzir N_2 a NH_4^+ , e a dinitrogenase redutase (também chamada proteína Fe, codificada pelo gene *nifH*), responsável por doar elétrons para a dinitrogenase (BURRIS, 1991). Esta transferência de elétrons envolve a hidrólise de ATP, dessa forma, devido ao alto custo energético para a célula, o processo de fixação de nitrogênio é altamente controlado, tanto na atividade da nitrogenase quanto na expressão dos seus genes (POSTGATE, 1982).

Para o funcionamento do complexo da nitrogenase são necessários não apenas os produtos dos genes *nifHDK*, mas também os produtos de outros genes *nif* (de *nitrogen*

fixation), necessários para a regulação transcricional, biossíntese de cofatores e transporte de íons (DIXON; KHAN, 2004).

1.3 Genes *nif*

Klebsiella pneumoniae é um dos microrganismos-modelo para o processo de fixação de nitrogênio. Nesta bactéria foram identificados e seqüenciados 20 genes *nif* envolvidos no processo de fixação de nitrogênio: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVW*, *nifZM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ* (ARNOLD et al., 1988; MERRICK, 1988, 1993), que codificam para a biossíntese das proteínas do complexo da nitrogenase. Os genes *nifHDK* são os genes estruturais para o complexo da nitrogenase, enquanto os genes *nifLA* codificam para os reguladores transcricionais dos demais genes *nif*, as proteínas NifL e NifA, respectivamente (MERRICK, 1983, 1988; MERRICK et al., 1982).

O operon *nifHDK* de *A. brasilense* foi isolado baseado na similaridade com a sequência dos genes *nifHDK* de *K. pneumoniae* (QUIVIGER et al., 1982; PERROUD; BANDHARI; ELMERICH, 1985). Outros genes *nif* (*nifY*, *nifENX*, *nifUS*, *nifV*, *nifW*, *nifQ*, *nifA*, *nifB*), envolvidos no transporte de elétrons ao complexo da nitrogenase, na biossíntese de cofatores e na regulação da fixação de nitrogênio, foram isolados (GALIMAND et al., 1989; PASSAGLIA et al., 1991; MILCAMPS; KEYERS; VANDERLEYDEN, 1993; FRAZZON; SCHRANK, 1998; POTRICH et al., 2001). Com exceção dos genes *nifA* e *nifB*, todos estes genes *nif* estão localizados em um cluster maior de 40kb, que contém os genes *nifHDK* (LIANG; KAMINSKI; ELMERICH, 1991). Foram identificados os seguintes operons nesta região: *nifHDKorf1Y*, *nifENXorf3orf5fdxAnifQ*, *nifW* e *orf2nifUSVorf4* e a análise da sequência de nucleotídeos do promotor do operon *nifENXorf3orf5fdxAnifQ* revelou a presença de sítios de ligação do cofator σ^{54} e da proteína NifA a montante do gene *nifE*, mostrando que a ativação transcricional desses genes *nif* é dependente da NifA (POTRICH et al., 2001). Potrich e colaboradores (2001) demonstraram também que o promotor do gene *nifE* é aproximadamente duas vezes menos ativo que o promotor do gene *nifH*.

Em muitos microrganismos diazotróficos os genes *nif* são transcritos por uma forma alternativa da RNA polimerase holoenzima e requerem um ativador transcricional, a proteína NifA (MERRICK, 1992). Esta proteína é ativadora da transcrição dos genes *nif* e tem sua atividade controlada/reprimida pela proteína NifL na presença de oxigênio e de altas

concentrações de nitrogênio fixado. Este mecanismo de regulação de NifA, dependente de NifL, é encontrado em bactérias diazotróficas entéricas do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter* e no diazotrofo encontrado no solo *Azotobacter vinelandii* (MERRICK et al., 1982; BLANCO et al., 1993; MERRICK, 2004). Em *A. brasilense* e em membros da família *Rhizobiaceae* o gene *nifL* não é encontrado, mas a proteína NifA tem sua atividade controlada pelos níveis de amônio e de oxigênio (ARSÈNE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996; FISCHER; BRUDERER; HENNECKE, 1988), sendo o gene *nifA* de *A. brasilense* expresso tanto na presença de oxigênio quanto de nitrogênio fixado (FADEL-PICHETH et al., 1999).

1.4 Regulação transcricional da nitrogenase

1.4.1 Proteína NifA

A proteína NifA pertence à família das EBP's (*enhancer-binding proteins*), envolvida na ativação da transcrição de genes em resposta a estímulos celulares. Nas Proteobactérias os genes *nif* estão sujeitos a ativação transcricional pela NifA, juntamente com o fator σ^{54} da RNA polimerase (DIXON; KHAN, 2004). A NifA se liga a uma região UAS (*upstream activation sequence*), caracterizada pelo motivo TGTN₁₀ACA (sendo N qualquer nucleotídeo), no promotor dos genes *nif* localizada a montante do sítio de início da transcrição (BUCK; CANNON; WOODCOCK, 1987; MORETT; BUCK, 1988). Para o início da transcrição, o *core* da RNA polimerase deve se combinar com uma subunidade dissociável, a subunidade sigma (σ), para formar a RNA polimerase holoenzima. Essas proteínas (fator σ) são essenciais para o funcionamento da RNA polimerase holoenzima (BUCK et al., 2000).

Os diferentes fatores σ identificados nas bactérias podem ser agrupados em duas classes: a classe cujo único membro é o σ^{54} e a classe σ^{70} . O fator σ^{54} (ou σ^N) difere da classe σ^{70} tanto na sequência de aminoácidos quanto no mecanismo de transcrição (MERRICK, 1993; LONETTO; GRIBSKOV; GROSS, 1992). Normalmente apenas uma forma do fator σ^{54} está presente no microrganismo, em contraste com os fatores pertencentes à classe σ^{70} . Apesar disso, a RNA polimerase holoenzima- σ^{54} pode ser regulada em uma variedade de genes em virtude das EBP's (como a NifA), que possuem sítios específicos de ligação aos promotores (COLLADO-VIDES; MAGASANIK; GRALLA, 1991). Cada EBP é controlada por uma via

própria de transdução de sinais, permitindo assim que apenas um tipo de σ^{54} medeie as respostas transcricionais a uma variedade de sinais fisiológicos e ambientais.

1.4.1.1 Estrutura e função dos domínios da proteína NifA

As proteínas NifA de diversos organismos são estruturalmente similares e apresentam um arranjo estrutural contendo três domínios funcionais separados por dois interdomínios (FISCHER; BRUDERER; HENNECKE, 1988; DRUMMOND; WHITTY; WOOTTON, 1986; DRUMMOND; CONTRERAS; MITCHENALL, 1990). O domínio amino-terminal (N-terminal), que apresenta função regulatória, é o domínio menos conservado entre os microrganismos, apresentando número variado de aminoácidos (MORETT; SEGOVIA, 1993) e em *A. brasilense* é responsável pelo controle negativo da atividade da proteína na presença de íons amônio (ARSÈNE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996). O domínio central possui em média 240 aminoácidos, é altamente conservado em toda a sua extensão (MORETT; SEGOVIA, 1993), está envolvido na interação com o fator σ^{54} da RNA polimerase e possui um motivo AAA de hidrólise do ATP (GONZÁLEZ et al., 1998; WALKER et al., 1982). O domínio carboxi-terminal (C-terminal) é o menor domínio, possui entre 65 e 130 aminoácidos e apresenta um motivo hélice-volta-hélice conservado responsável pela ligação da proteína ao sítio UAS presente na região promotora dos genes *nif* (MORETT; CANNON; BUCK, 1988). Em *A. brasilense*, os domínios Central e C-terminal são ligados pela região interdomínios (IDL). No fim do domínio central e início da região interdomínios IDL há um motivo contendo resíduos de cisteínas, provavelmente envolvidos com a sensibilidade ao oxigênio (FISCHER, 1994). A Figura 1 mostra um modelo esquemático dos domínios da proteína NifA de *A. brasilense* destacando os motivos conservados de cisteínas, no final do domínio central e início da região inter-domínios IDL, e hélice-volta-hélice de ligação ao DNA no domínio C-terminal.

Na região N-terminal de várias proteínas NifA há um domínio denominado GAF. A denominação GAF foi-lhe atribuída após a descoberta de três proteínas que contêm este domínio: fosfodiesterases estimuladas por cGMP, Adenilil ciclase de *Anabaena* e FhlA de *E. coli*. O domínio GAF é uma região sinalizadora encontrada em todos os reinos e no qual, em alguns casos, tem sido demonstrada a ligação de pequenas moléculas, como nucleotídeos cíclicos (CHARBONNEAU et al., 1990; ARVIND; PONTING, 1997; HO; BURDEN;

HURLEY, 2000). O domínio GAF de várias NifA possui papel na regulação da atividade da NifA, porém em muitos casos o mecanismo de regulação não é claro, exercendo diversas funções em diferentes diazotrofos (DIXON e KHAN, 2004). Por exemplo, a ligação de 2-oxoglutarato ao domínio GAF da NifA de *Azotobacter vinelandii* provavelmente induz mudanças conformacionais que previnem a inibição da sua atividade pela NifL sob condições limitantes de nitrogênio, enquanto que a ligação de 2-oxoglutarato ao GAF da NifA de *K. pneumoniae* não foi observada (LITTLE e DIXON, 2003). Em *A. brasilense* o domínio GAF regula a atividade da NifA em resposta à concentração de nitrogênio fixado e parece interagir com a proteína transdutora de sinal GlnB (ARSÈNE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996, 1999).

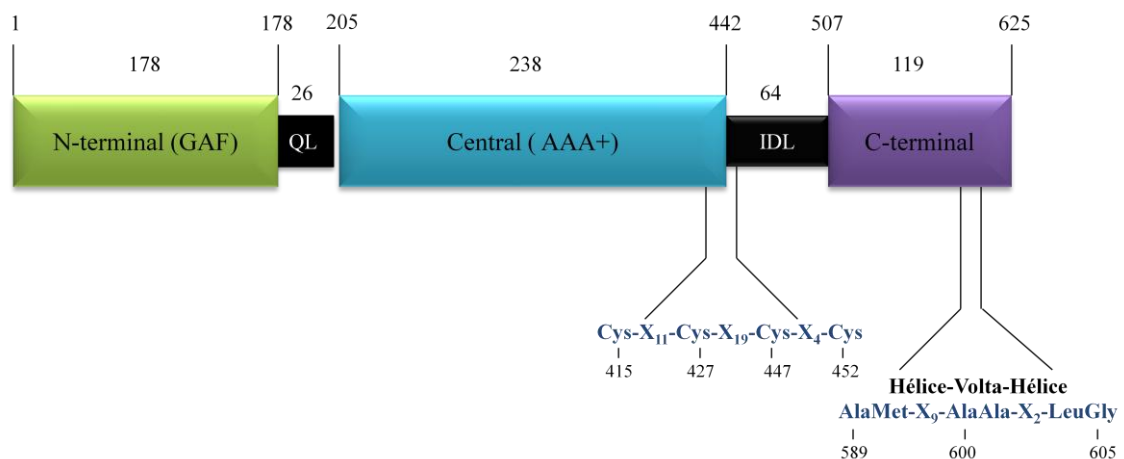


Figura 1 Modelo estrutural esquemático da proteína NifA de *Azospirillum brasilense*. Os domínios funcionais são apresentados. Os números em preto representam o número de aminoácidos presentes em cada domínio. A região conservada de cisteínas e o motivo hélice- volta-hélice de ligação ao DNA estão mostrados em azul.

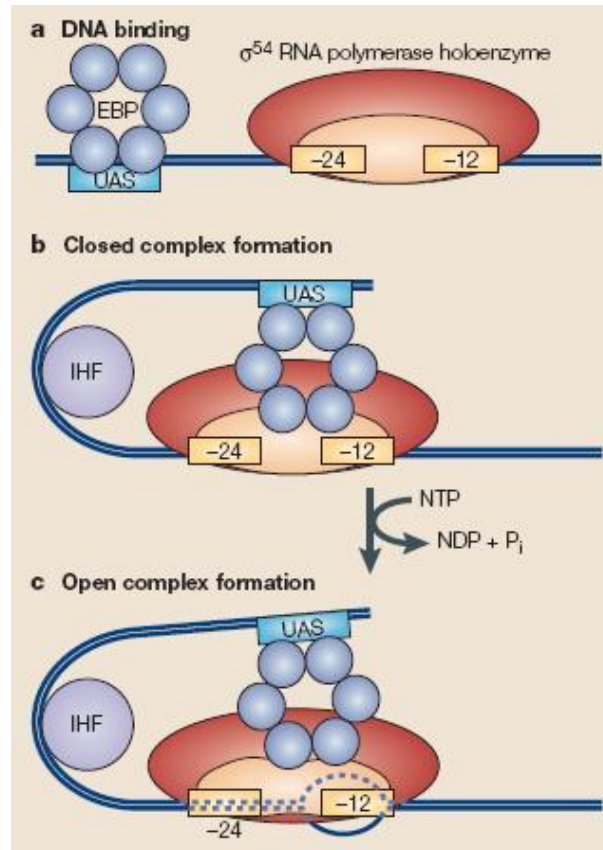
1.4.2 Formação do complexo RNA polimerase - DNA e início da transcrição

A proteína NifA e a RNA polimerase holoenzima contendo o fator σ^{54} alternativo ativam a transcrição dos genes *nif*. Uma das características deste sistema é o reconhecimento de uma região promotora do DNA com uma sequência consenso localizada a -12 e -24 bases do início da transcrição (MORETT; SEGOVIA, 1993).

O processo de transcrição dependente do fator σ^{54} envolve etapas de ligação de proteínas no DNA e a formação do complexo aberto da RNA polimerase (Figura 2). O complexo σ^{54} -RNA polimerase holoenzima reconhece uma seqüência promotora consenso localizada a -12 e -24 pares de base do sítio de início da transcrição (Figura 2A). Entretanto, a RNA polimerase é incapaz de iniciar a transcrição na ausência de uma proteína EBP, como a NifA (POPHAM et al., 1989; MERRICK, 1993; LEE; BERGER; KUSTU, 1993).

A interação entre a EBP com a σ^{54} -RNA polimerase é facilitada pela ligação da EBP a uma região do DNA denominada UAS localizada a montante da região promotora -24/-12. Para a ativação transcricional é necessária uma interação física entre a RNA polimerase e a EBP. O DNA forma uma dobra para que esta ligação se estabeleça. Em alguns casos outras proteínas ligadoras de DNA, como as IHF (*integration host factor*) são requeridas para que haja a formação deste complexo fechado (Figura 2B). A hidrólise de nucleotídeos (por exemplo, ATP) exercida pela EBP fornece energia e promove a reestruturação do complexo fechado que favorece a formação do complexo aberto, no qual as fitas de DNA na região a ser transcrita estão desnaturadas (Figura 2C) (BUCK et al., 2000). De uma forma geral, é dessa maneira que a proteína NifA age como uma ativadora transcricional dos genes *nif* de *A. brasilense* envolvidos na fixação biológica de nitrogênio.

A proteína NifA de *A. brasilense* é expressa constitutivamente e apresenta-se normalmente numa forma inativa, tornando-se ativa em condições de fixação de nitrogênio, ou seja, na ausência de amônio e sob baixa concentração de oxigênio (LIANG; KAMINSKI; ELMERICH, 1991; LIANG et al., 1992; FADEL-PICHETH et al., 1999). Os níveis de NH_4^+ são indicados por uma proteína sinalizadora, provavelmente a proteína PII GlnB (ARSÈNE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996; BENELLI et al., 1997; SOUZA et al., 1999). Estudos anteriores demonstraram que a GlnB é necessária para a ativação da NifA (ARAÚJO et al., 2004), prevenindo a inibição da atividade da NifA pelo domínio N-terminal, indicando que a porção N-terminal tem papel regulatório e não é essencial para a sua atividade de ativadora transcricional (ARSÈNE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996).



Fonte: DIXON e KHAN (2004)

Figura 2 Modelo esquemático do processo de ativação da transcrição a partir de promotor localizado a -24/-12 bases do início da transcrição. (A) Ligação de uma EBP (por exemplo, NifA) à região UAS do DNA; (B) formação do complexo fechado que possibilita a interação da EBP com a RNA polimerase; (C) formação do complexo aberto e início da transcrição.

1.5 Proteínas do tipo PII

As proteínas da família PII estão envolvidas na regulação do metabolismo de nitrogênio e têm sido encontradas em uma variedade de bactérias de uma forma muito conservada (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). Elas recebem esse nome desde que foram identificadas, em 1969, devido ao seu pico de eluição em coluna de gel filtração ter sido o segundo, daí a denominação PII (SHAPIRO, 1969).

Genes codificando para proteínas PII são encontrados em proteobactérias, actinobactérias, firmibactérias, cianobactérias, arqueobactérias e também em plantas superiores e apresentam alto grau de similaridade. Vários organismos apresentam mais de uma proteína PII e a nomenclatura utilizada refere-se não somente à seqüência de aminoácidos como também à presença de determinados genes localizados no mesmo operon.

Entre as proteínas PII, dois dos maiores grupos são das proteínas GlnB e GlnK, codificadas pelos genes *glnB* e *glnK*, respectivamente (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). Estes genes foram inicialmente descritos em *E. coli* por Son e Rhee (1987) e por van Heeswijk et al. (1996).

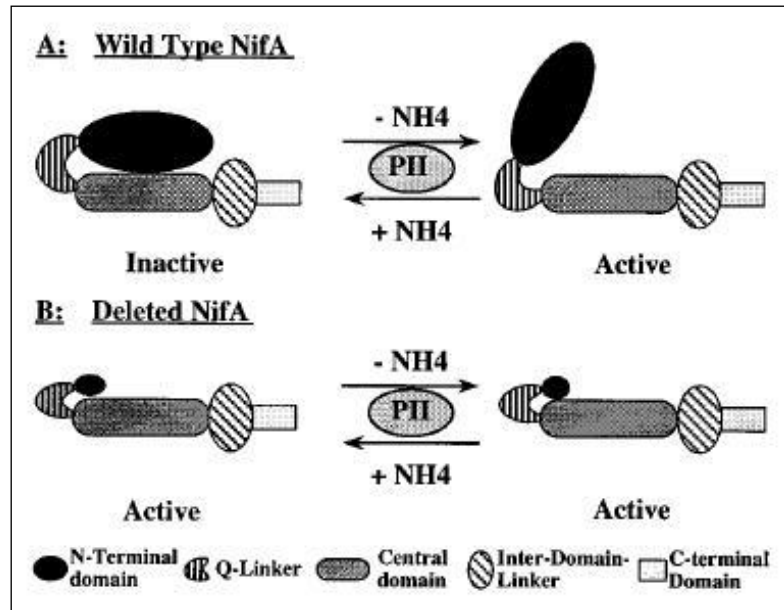
O gene *glnB* de *A. brasilense* foi identificado por de Zamaroczy, Delorme e Elmerich (1990) e codifica para a proteína GlnB. Esta proteína é sintetizada em altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio e em baixos níveis sob condições de excesso de nitrogênio (de ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990; de ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993; HUERGO et al., 2003). Em 1996, de Zamaroczy et al. identificaram um gene que codifica para outra proteína PII em *A. brasilense* e denominaram-na GlnZ. Apesar de sua alta similaridade com a proteína PII GlnB, GlnZ possui função diferente e está envolvida no transporte de íons amônio (de ZAMAROCZY, 1998) e regulação pós-traducional da nitrogenase (HUERGO et al., 2005).

Arsène et al. (1996) demonstraram que GlnB ou algum componente sob controle da PII é necessário para prevenir a inibição da proteína NifA pelo domínio N-terminal (Figura 3). Em seu estudo, Arsène et al. (1996) construíram quatro tipos de deleções no domínio N-terminal da proteína NifA e observaram que esta estava sempre ativa, independente da presença ou ausência de GlnB e de amônio, e sugeriram que o domínio N-terminal seria o responsável pela inibição (Figura 3). Araújo et al. (2004) avaliaram o papel das proteínas tipo PII na atividade da proteína NifA de *A. brasilense*, que foi expressa em *E. coli* e cuja atividade foi determinada pela capacidade de ativação do promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae* como uma fusão *nifH::lacZ*. Os autores demonstraram que a proteína PII GlnB, é essencial para a atividade da NifA na ausência de amônio e de oxigênio em *E. coli*, e que a GlnB não pode ser substituída pelas suas parálogas GlnZ ou GlnK, apesar da alta similaridade entre elas.

Em 1999, Arsène, Kaminski e Elmerich apresentaram resultados mostrando que o resíduo de Tyr-18 do domínio N-terminal de NifA de *Azospirillum brasilense* possui papel importante no controle da atividade da NifA uma vez que um mutante neste resíduo não sofre regulação por GlnB. Chen e colaboradores (2005), utilizando sistema de duplo-híbrido em levedura, mostraram que GlnB se liga ao domínio GAF da NifA de *Azospirillum brasilense*, favorecendo o mecanismo que envolve a interação direta proteína-proteína entre GlnB e o domínio N-terminal da NifA. Estes mesmos autores também realizaram ensaios de interação

de GlnB com a proteína NifA mutada nos resíduos Tyr-18 e Tyr-53. Seus resultados indicam que ambos os resíduos possuem papel crítico na manutenção do efeito inibitório do domínio N-terminal sobre a atividade da NifA. Todas as proteínas mutadas apresentaram-se hiperativas, sendo que mutações únicas na Tyr-18 ou na Tyr-53 resultaram em proteínas NifA que mantêm a capacidade de ligar GlnB, enquanto que a proteína NifA mutante dupla em ambas as Tyr não mantém esta capacidade de interação com GlnB. Dessa forma os autores acreditam que é improvável que os resíduos 18 e 53 sejam alvo de modificação covalente para ativar NifA, e que o fato de as proteínas mutantes, em particular as mutadas em Tyr-18 e em Tyr18/53, terem apresentado alta atividade nitrogenase que permanece sendo regulada por amônio, mas não por GlnB favorece a idéia de que os controles da atividade da NifA exercidos por amônio e por GlnB envolvem diferentes mecanismos.

Através de ensaio de co-precipitação *in vitro* (*pull-down*) Zhou, Zou e Li (2008) confirmaram que GlnB interage com o domínio N-terminal da NifA de *A. brasilense* em *E. coli* e sugeriram que os resíduos 66-88 e 165-176 do domínio N-terminal possuem função crítica na interação com GlnB.



Fonte: ARSÈNE et al. (1996)

Figura 3 Modelo da regulação da atividade da proteína NifA em resposta a amônio e na presença da proteína PII. **(A)** Proteína NifA selvagem: sofre inibição pelo domínio N-terminal na presença de amônio e da proteína PII. **(B)** Proteína NifA N-truncada: não sofre inibição devido à ausência do domínio N-terminal, estando sempre ativa na presença da PII e na ausência ou presença de amônio.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense*.

2.2 Objetivos específicos

- Amplificar e clonar o gene que codifica para a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense*
- Expressar e purificar a proteína NifA N-truncada
- Realizar ensaios *in vitro* de atividade de ligação da proteína NifA N-truncada purificada de *A. brasilense* à região promotora do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*
- Realizar ensaios *in vivo* de ativação transcricional pela NifA N-truncada na presença e na ausência do domínio N-terminal da NifA e de íons NH_4^+

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bactérias e plasmídeos

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas

Estirpe de <i>Escherichia coli</i>	Genótipo ou Características relevantes	Referência
DH10B	F ⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ ⁻ Sm ^R	Sambrook et al., 1989
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Sambrook et al., 1989
JM109 (DE3)	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^g</i> <i>lacZΔM15</i>] (JM109 produtora da RNA polimerase do fago T7)	Sambrook et al., 1989

Tabela 2 – Plasmídeos utilizados

Plasmídeos	Genótipo ou Características relevantes	Referência
pTZ57R/T	Vetor de clonagem. Amp ^R	Fermentas
pET28a	Vetor de expressão promotor T7. Expressa a proteína em fusão com His- Tag na porção N-terminal. Km ^R	Novagen
pT7-7	Vetor de expressão/ promotor T7. Amp ^R	Tabor e Richardson, 1985
pDK5	Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> . Amp ^R	Kleiner; Paul e Merrick, 1988
pDK6	Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> . Km ^R	Kleiner; Paul e Merrick, 1988
pDK7	Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> . Cm ^R	Kleiner; Paul e Merrick, 1988
pTZ18R	Vetor de expressão, pTZ19R com o sítio de policlonagem invertido/ promotor <i>lac</i> . Amp ^R	Mead; Szczena-skorupa e Kemper, 1986

pTZ19R	Vetor de expressão/ promotor <i>lac</i> . Amp ^R	Mead; Szczena-skorupa e Kemper, 1986
pLANifApET	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado em vetor pET28a. Km ^R	Araújo, 2008
pML2A	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pTZ19R. Amp ^R	Ishida, 1996
pCN57RCCT	Contém a sequência codificadora da proteína NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> clonada no vetor pTZ57R/T. Amp ^R	Este trabalho
pCNpETCCT	Expressa a proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> a partir de promotor T7 (vetor pET28a). Km ^R	Este trabalho
pCNT7CCT	Expressa a proteína NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> a partir de promotor T7 (vetor pT7-7). Km ^R	Este trabalho
pCNK5CCT	Expressa a proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> a partir de promotor <i>tac</i> (vetor pDK5). Amp ^R	Este trabalho
pCNK6CCT	Expressa a proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> a partir de promotor <i>tac</i> (vetor pDK6). Km ^R	Este trabalho
pCNK7CCT	Expressa a proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> a partir de promotor <i>tac</i> (vetor pDK7). Cm ^R	Este trabalho
pLANTpET	Expressa o domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> fusionado a cauda His a partir de promotor T7 (vetor pET28a). Km ^R	Araújo, 2008
pCNK5NT	Expressa o domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> fusionado a cauda His na porção N-terminal a partir de promotor <i>tac</i> (vetor pDK5). Amp ^R	Este trabalho
pCNK7NT	Expressa o domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> fusionado a cauda His na porção N-terminal a partir de promotor <i>tac</i> (vetor pDK7). Cm ^R	Este trabalho
pCN18RNT	Expressa o domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> fusionado a cauda His a partir de promotor <i>lac</i> (vetor pTZ18R). Amp ^R	Este trabalho
pTZPNIFB	Contém a sequência da região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada em vetor pTZ18R. Amp ^R	Rego, 2006
pCN57RnifB	Contém a sequência da região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada em vetor pTZ57R/T. Amp ^R	Este trabalho
pRT22	<i>nifH</i> (<i>K. pneumoniae</i>):: <i>lacZ</i> / Cm ^R	Tuli e Merrick, 1988

3.2 Meios de cultura

Os meios de cultura que foram utilizados para o cultivo das estirpes de *Escherichia coli* foram o Luria-Bertani Broth (LB) e Luria-Bertani Ágar (LA) (SAMBROOK et al, 1989), Nitrogen-Free Davis e Mignoli (NFDM) (CANNON; DIXON; POSTGATE, 1974), SOB e SOC (SAMBROOK et al, 1989). As culturas em meio líquido, com exceção das em meio NFDM, foram incubadas a 37°C sob agitação de 120rpm e as culturas em meio sólido a 37°C sem agitação. As culturas em meio NFDM foram incubadas a 30°C sob agitação de 120rpm.

O meio LB possui a seguinte composição:

	g/L
Extrato de levedura	5,0
NaCl	10,0
Triptona	10,0

Para a obtenção do meio LA, usado para cultivo em meio sólido, adicionou-se 15 g/L de ágar ao meio LB.

O meio SOB possui a seguinte composição:

	g/L
Triptona	20
NaCl	0,6
KCl	0,186

O meio SOC foi obtido adicionando-se ao meio SOB os seguintes componentes:

	g/L
Glucose	3,6
MgCl ₂	0,94
MgSO ₄	1,2

O meio NFDM possui a seguinte composição:

	g/L
MgSO ₄	0,1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,025

No momento do uso, foram adicionados ao meio 20g/L glucose, 12,06g/L K₂HPO₄ e 3,4g/L KH₂PO₄.

3.3 Antibióticos

Os antibióticos utilizados estão descritos na Tabela 3 e foram adicionados ao meio de cultura de acordo com a resistência da estirpe de *E. coli* ou do vetor.

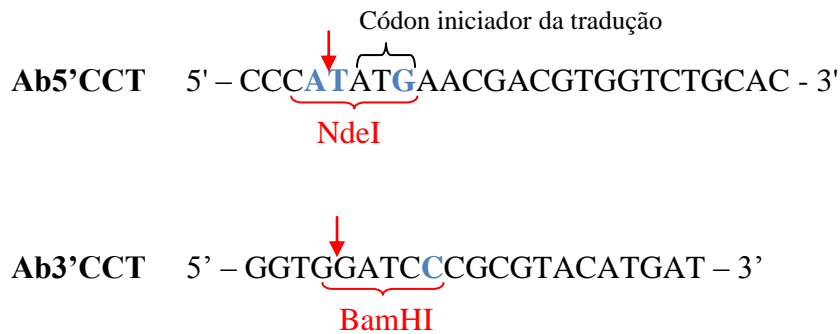
Tabela 3 – Concentrações de antibióticos utilizadas

Antibióticos	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	250	200
Canamicina (Km)	100	50
Cloranfenicol (Cm)	30	30
Estreptomicina (Sm)	80	80

As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por Sambrook et al. (1989) e armazenadas a -20°C. As soluções que estavam em uso foram armazenadas a 4°C.

3.4 Amplificação do DNA por PCR

A amplificação do gene que codifica para os domínios central+carboxi-terminal (CCT) da proteína NifA de *A. brasilense* foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER; WILSON, 1991). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados foram sintetizados quimicamente (Invitrogen). Foi introduzido um sítio de restrição em cada *primer* para facilitar a subclonagem em vetores de interesse e um códon iniciador da tradução (sequência ATG). A sequência dos *primers* está representada abaixo:



Oligonucleotídeos iniciadores sintetizados quimicamente utilizados para a amplificação dos domínios central+C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*. As setas indicam o sítio de clivagem das enzimas, indicadas abaixo da sequência. Os nucleotídeos em azul foram modificados para a criação dos sítios de restrição.

A reação de amplificação continha tampão de PCR (75mM Tris-HCl pH8,8, 20mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% (v/v) Tween 20); aproximadamente 20ng de DNA plasmidial (pML2A); 0,2mM de dNTP's; 1,5mM de MgCl₂; 10pmol de cada *primer*, 5% (v/v) de DMSO, 2U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Fermentas) e água MilliQ[®] q.s.p 20μL.

O programa utilizado constou de 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial do DNA molde; 25 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 30 segundos de anelamento em temperaturas de 52,7°C, 55,4°C, 58,1°C ou 60,4°C e 2 minutos a 72°C, temperatura ótima de extensão da *Taq* DNA polimerase; e 1 ciclo de 5 minutos a 72°C para extensão final.

3.5 Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de ágar ou agarose horizontal conforme descrito por Sambrook et al. (1989) com modificações. Os géis foram preparados na concentração desejada (0,8-1,5%) em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato pH8,3 e 1mM EDTA) ou TBE 1X (89 mM de Tris base, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA pH 8,0). As amostras foram misturadas com tampão FSUDS (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA pH 8,0, 0,025% azul de bromofenol; 0,025% xileno cianol, 0,1% SDS, 20% Ficoll) e a corrida foi realizada no mesmo tampão em que o gel foi preparado, a 60V por um período

variável de acordo com a concentração do gel e os tamanhos dos fragmentos que se desejou separar. O DNA foi visualizado, após tratamento com solução de brometo de etídio (1,0 µg/mL) por 15-30 minutos, em transluminador de luz ultravioleta (315nm). O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

3.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando didesoxirribonucleotídeos (SANGER, NICKLEN; COULSON, 1977). O produto da reação de sequenciamento de DNA foi submetido a um Sequenciador Automático de DNA (Applied Biosystems modelo 377) no qual quatro cromóforos fluorescentes são utilizados como terminadores de cadeia (sistema DYEnamic ET terminator da GE Healthcare), seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção a laser. Para a reação foram utilizados 100 a 200ng de plasmídeo purificado como molde, 3µL do sistema DYEnamic ET (GE Healthcare), 0,5pmol de primer e H₂O MilliQ[®] q.s.p. 7,5µL. Os programas utilizados para extensão da cadeia dependeram dos *primers* presentes na reação e foram basicamente dois: **1)** 1 ciclo de 2 minutos a 94°C e 30 ciclos de 30 segundos a 94°C e 1,5 minuto a 60°C; **2)** 1 ciclo de 2 minutos a 94°C; 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C e 1,5 minuto a 60°C. Ao produto desta reação foram adicionados H₂O MilliQ[®] q.s.p. 20µL, 2µL de acetato de amônio 7,5M e 60µL etanol 96% e após foram vortexados. A mistura foi incubada a 4°C por 30 minutos sendo posteriormente centrifugada a 11.300xg por 30 minutos. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco a temperatura ambiente. As sequências de nucleotídeos foram analisadas através do programa BLASTn (NCBI).

3.7 Purificação de plasmídeo

Alíquotas de 1,5 mL de culturas de *E. coli* cultivadas em meio LB a 37°C sob agitação constante (120 rpm) por aproximadamente 16 horas foram coletadas por centrifugação a 11.300xg por 1 minuto. O precipitado de células foi ressuspensão em 200 µL de tampão GET (50 mmol/L glucose, 10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L Tris-HCl) e lisado com a adição de 200 µL de solução de lise (0,2 mol/L NaOH e 1% SDS), a amostra foi

homogeneizada por inversão até a ocorrência da lise. O lisado foi neutralizado pela adição de 200 μL de 3,0 mol/L de acetato de potássio e 1,8 mol/L de ácido fórmico, a mistura foi homogeneizada e incubada em banho de gelo por 15 minutos. Após centrifugação de 5 minutos a 11.300xg, ao sobrenadante foi adicionado 50 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 11.300xg e a fase aquosa foi coletada em tubo novo. A esta fase aquosa foi adicionado 2 volumes de etanol 96% seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente para que ocorra a precipitação do DNA. Após 15 minutos de centrifugação a 11.300xg, o DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 11.300xg. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em água ultrapura estéril.

3.8 Purificação de DNA por eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão

A amostra contendo o DNA de interesse foi submetida a uma eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão 1% a 35V. Após corrida eletroforética o gel foi corado por 5 minutos em solução 0,2% de azul de metileno e descorado em água MilliQ[®]. A banda de interesse no gel foi cortada e o DNA foi purificado utilizando o “ kit” GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

3.9 Quantificação de DNA

3.9.1 Determinação espectrofotométrica da quantidade de DNA

A quantificação de DNA foi realizada por método espectrofotométrico, como descrito por Sambrook et al. (1989). Para a determinação da quantidade de DNA em uma amostra foram realizadas leituras a 260nm e a 280nm. A leitura a 260nm permite o cálculo da concentração de ácido nucléico, sendo que uma D.O.=1 corresponde a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA dupla-fita. A razão entre as leituras a 260nm e 280nm (D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀) fornece uma estimativa da pureza da extração do ácido nucléico. Amostras de DNA purificado apresentam uma razão D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ de 1,8. Na presença de contaminantes como

proteína e fenol, a razão será menor que 1,8 e a quantificação de DNA não será corretamente determinada.

3.9.2 Quantificação de DNA dupla-fita por fluorescência emitida por brometo de etídio

Este método, também descrito por Sambrook et al. (1989), foi utilizado quando a quantidade de DNA não era suficiente para determinação espectrofotométrica (<250ng/mL) ou quando a amostra de DNA apresentava-se contaminada com outras substâncias que absorvem radiação ultravioleta. A estimativa da quantidade de DNA nas amostras é feita utilizando fluorescência emitida pelo brometo de etídio intercalado no DNA. Como a intensidade da fluorescência é proporcional à massa total de DNA, a quantidade de DNA na amostra pode ser estimada comparando-se a fluorescência da amostra com a fluorescência de um padrão. Quantidades pequenas de DNA como 1-5ng podem ser detectadas por este método.

Para a quantificação por este método, o padrão de DNA 1Kb DNA ladder (Fermentas) de concentração definida foi aplicado em gel de agarose juntamente com um volume conhecido da amostra de DNA. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídeo e visualizado com transiluminador UV acoplado a um sistema de vídeo-imagem (UVP). Através do programa LabWorks Image Acquisition and Analysis Software é medida a densidade de cada banda do padrão, que é proporcional à quantidade de DNA. A partir dos dados de densidade e quantidade de DNA por banda do padrão foi feito um gráfico de dispersão e uma regressão linear. Com a equação de reta foi possível determinar a quantidade de DNA da amostra a partir do dado de densidade da sua banda correspondente.

3.10 Clivagem de DNA com enzima de restrição

Endonucleases de restrição foram adquiridas da Invitrogen, Fermentas ou GE Healthcare. As reações de restrição foram realizadas de acordo com as condições sugeridas pelo fabricante.

3.11 Ligação de DNA

O DNA plasmidial linearizado foi misturado ao DNA inserto na proporção 1:5 (mol) em tampão de ligação (40mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5mM ATP), aquecido a aproximadamente 60°C por 5 minutos e resfriado em banho de gelo. Em seguida foi adicionado ao sistema 1U a 2U de T4 DNA ligase (Fermentas) e a mistura foi incubada a 16°-20°C por pelo menos 16 horas.

3.12 Análise de plasmídeos recombinantes

A análise de plasmídeos recombinantes foi realizada através da metodologia de Rapidprep descrita por Monteiro et al. (2001). Duzentos microlitros de uma cultura saturada, cultivadas por aproximadamente 16 horas em meio LB, foram transferidos para tubos tipo Eppendorf e centrifugados por 30 a 60 segundos. As células foram ressuspensas em 40µL de solução RL (10% glicerol, 5µg/mL RNase, 0,05% azul de bromofenol), lisadas com a adição de 10µl de SDS 10% e misturadas por inversão com cuidado, evitando-se a quebra do DNA cromossomal. Esta mistura foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente para a completa lise celular. Para a precipitação de proteínas e DNA cromossomal foram adicionados 5µL de KCl 3M seguido de incubação em gelo por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 11.300xg por 2 minutos. Quinze microlitros da fração sobrenadante contendo os plasmídeos foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,0%. Os clones obtidos foram comparados com o plasmídeo sem inserto como padrão, que migra mais rapidamente. Após essa análise alguns clones foram escolhidos para a purificação do plasmídeo (item 3.7) e confirmação do clone por reação de restrição (item 3.10).

3.13 Transformação bacteriana por eletroporação

3.13.1 Preparo de células eletrocompetentes

Uma colônia de *E. coli* crescida em meio LA foi inoculada em 5mL de meio SOB na presença de antibióticos, a cultura foi incubada sob agitação (120rpm) por cerca de 16 horas a

37°C. Três mililitros deste pré-inóculo foram transferidos para um frasco de 1L contendo 300mL de SOB, esta cultura foi incubada a 37°C até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. A cultura foi mantida no gelo por 20 a 30 minutos e centrifugada a 2.500xg por 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com água MilliQ[®] gelada estéril, sendo a primeira lavagem com 1 volume igual ao utilizado de meio e a segunda com ½ deste volume, utilizando as mesmas condições de centrifugação (2.500xg por 5 minutos a 4°C). O sedimento de células foi ressuspensão em 5mL de glicerol 15% estéril gelado. Após nova centrifugação a 2.500xg por 10 minutos a 4°C, o glicerol foi removido por inversão do tubo e as células foram suspensas no restante da solução presente no tubo. As células foram aliqüotadas (40µL) e utilizadas para eletroporação no mesmo dia ou armazenadas a -70°C por até 6 meses.

3.13.2 Eletroporação

A eletroporação foi realizada adicionando-se 1µL da mistura de ligação ou 50ng de plasmídeo íntegro com 40µL de células eletrocompetentes previamente descongeladas e mantidas em banho de gelo. A mistura foi transferida para a cubeta de eletroporação com 0,2cm de distância entre os eletrodos e submetida a um pulso elétrico de aproximadamente 4kΩ, 15kV/cm (voltagem aplicada/distância entre os eletrodos). Após o pulso elétrico foi adicionado 1mL de meio SOC à cubeta de eletroporação. A suspensão de células foi transferida para um frasco estéril e incubada a 37°C por cerca de 40 minutos para recuperação. Aliqüotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo antibiótico adequado.

3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida

3.14.1 Eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante como descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel de empilhamento foi de 4,5% e a do gel de separação variou de 10% a 12,5% de acordo com a massa molecular da proteína a ser analisada. A solução estoque de poliacrilamida utilizada foi de 30% e apresentava relação acrilamida:bis-acrilamida de 29,2:0,8. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical

de acordo com orientação do fabricante (Hoefler). As amostras de proteínas foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol) e fervidas por 3 minutos. A corrida eletroforética foi realizada a 160-180V em tampão tris-glicina-SDS (25mM tris-base, 192mM glicina, 0,1% SDS). As proteínas foram coradas com corante Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25% Coomassie Blue R-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial).

3.14.2 Eletroforese sob condições não desnaturantes

Os ensaios de retardamento de banda em gel foram realizados em gel de poliacrilamida (30%) não desnaturante 4% em tampão tris-glicina (25mM Tris-base, 192mM Glicina). A corrida foi realizada a 4°C em voltagem de 60V por 4 horas utilizando tampão tris-glicina com 8mM $MgCl_2$.

3.15 Expressão da proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense*

Para a expressão da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* o plasmídeo pCNpETCCT foi transformado por eletroporação em *E. coli* estirpe BL21 (DE3). Uma colônia desta bactéria foi inoculada em 3mL de meio LB contendo antibiótico canamicina e incubada a 37°C durante a noite. Esta cultura foi inoculada em 300mL de LB na proporção de 1:100 e incubada sob agitação constante (120rpm) a 30°C até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,5 e 0,7. Neste momento foi adicionado 0,5mM IPTG e a cultura foi incubada a 18°C por aproximadamente 16 horas sob agitação (120rpm). Após a indução as células foram coletadas por centrifugação a 4.700xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, a massa de células úmidas foi determinada e as células ressuspensas em 3volumes (g/mL) de tampão de sonicação (0,5mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 10% glicerol, 1mM DTT). Para diminuir a ação de proteases foi adicionado 1mM de PMSF. As células foram lisadas em banho de gelo por sonicação em um sonicador Heat System equipado com micropona em 10 ciclos de 20 segundos, com intervalos de 30 segundos entre cada ciclo para evitar o aquecimento da amostra e a desnaturação da proteína. Uma alíquota do extrato celular total foi armazenada para posterior análise e o restante do extrato foi centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a

4°C. O sobrenadante foi retirado e passado para novo tubo e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspensão em água MilliQ[®] para análise da fração insolúvel e uma fração do sobrenadante também foi armazenada. As frações foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE como descrito por Laemmli (1970). O restante da fração solúvel foi utilizada para purificação da proteína His-NifA N-truncada.

3.16 Purificação da proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense*

3.16.1 Purificação em coluna HiTrap Chelating Ni²⁺

O plasmídeo pCNpETCCT expressa a proteína NifA N-truncada fusionada a uma cauda com 6 histidinas na porção amino-terminal. Através dessa cauda de histidinas a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de 1 mL Hi-Trap Chelating Ni²⁺ (GE Healthcare) acoplada a uma bomba peristáltica, seguindo instruções do fornecedor. Para a purificação da proteína nesta coluna foram utilizados os seguintes tampões:

Tabela 4 – Tampões utilizados para purificação da proteína His-NifA N-truncada em coluna Hi-Trap Chelating Ni²⁺

Tampão	Tris-HCl pH 8,0 (mM)	NaCl (mM)	Glicerol (%)	DTT (mM)	Imidazol (mM)
Tp1	50	500	5	0,1	50
Tp2	50	500	5	0,1	100
Tp3	50	500	5	0,1	200
Tp4	50	500	5	0,1	250
Tp5	50	500	5	0,1	300
Tp6	50	500	5	0,1	400
Tp7	50	500	5	0,1	1000

A coluna foi inicialmente equilibrada com 5 volumes de Tp1. Após sonicação da amostra, a fração solúvel contendo a proteína His-NifA N-truncada (item 3.15) foi aplicada na coluna. A coluna foi lavada com 2 volumes do Tp1. A eluição da proteína foi realizada com um gradiente crescente de imidazol com 2 volumes do Tp2 e 1 volume de cada um dos

demais tampões Tp3, Tp4, Tp5, Tp6 e Tp7. Foram coletadas frações de 1mL e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. As frações nas quais a His-NifA N-truncada foi eluída em maior quantidade foram posteriormente purificadas em coluna Hi-Trap Heparin (GE Healthcare).

3.16.2 Purificação em coluna HiTrap Heparin

As frações obtidas na purificação anterior foram diluídas na proporção 1:1 em 50mM Tris-HCl pH8,0 para diminuir a concentração de sal inicial das frações a serem aplicadas na coluna de Heparina. Os tampões utilizados para purificação nesta coluna estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Tampões utilizados para purificação da proteína His-NifA N-truncada em coluna HiTrap Heparin

Tampão	Tris-HCl pH 7,5 (mM)	NaCl (mM)
Tp8	50	100
Tp9	50	500
Tp10	50	600
Tp11	50	700
Tp12	50	800
Tp13	50	900
Tp14	50	1000
Tp15	50	1500

A coluna HiTrap Heparin (GE Healthcare) de 1mL foi acoplada a uma bomba peristáltica e equilibrada com 5 volumes de Tp8. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 3 volumes de Tp8. A eluição foi feita com gradiente crescente de NaCl, sendo utilizado 1 volume de cada um dos tampões Tp9 e Tp10, ½ volume dos Tp11, Tp12, Tp13, Tp14 e 1 volume do Tp15. As frações coletadas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

3.17 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Este ensaio consiste na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína causando uma mudança no comprimento de onda de absorção máxima do corante de 565 para 595nm. É esta mudança na absorção a 595nm que é monitorada. A curva padrão foi determinada utilizando albumina de soro bovino. O ensaio foi realizado adicionando-se 1mL do reativo de Bradford (10 mg/L Coomassie Brilliant Blue G-250, 95% etanol e 85% ácido fosfórico para 1L de solução) a 100µL da amostra de proteínas. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595nm determinada entre 5 e 20 minutos após a adição do reagente.

3.18 Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*

3.18.1 Amplificação da região promotora do gene *nifB*

A região promotora do gene *nifB* foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluoróforos sintetizados quimicamente. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e os fluoróforos utilizados na marcação estão mostrados abaixo.

UNI: 5' – **FAM**-GTTGTAAAACGACGGCCAGT – 3'

REV: 5' – **VIC**-TTCACACAGGAAACAGCTATGAC – 3'

Oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluoróforos utilizados na reação de amplificação por PCR da região promotora do gene *nifB*. O *primer* UNI foi marcado com o fluoróforo FAM e o *primer* REV foi marcado com o fluoróforo VIC, ambos na extremidade 3'.

A reação de amplificação continha tampão de PCR (75mM Tris-HCl pH8,8, 20mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% (v/v) Tween 20); aproximadamente 50ng de DNA plasmidial (pCN57RnifB); 0,2mM de dNTP's; 1,5mM de MgCl₂; 10pmol de cada *primer*, 5% (v/v) de DMSO, 2U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Fermentas) e água MilliQ[®] q.s.p 50µL.

O programa utilizado constou de 1 ciclo de 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial do DNA molde e 32 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (anelamento) e 45 segundos a 72°C (extensão).

Para a obtenção do plasmídeo pCN57RnifB foi realizada uma reação de PCR utilizando o plasmídeo pTZPNIFB (REGO, 2006) como DNA molde e os oligonucleotídeos iniciadores p11 (5'-GTATTGATGGATTCCCCGGC-3') e p12 (5'-TCCAGCAAGGTGCCTAGCG-3'). A reação de amplificação continha tampão de PCR (75mM Tris-HCl pH8,8, 20mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% (v/v) Tween 20); aproximadamente 50ng de DNA molde (pTZPNIFB); 0,2mM de dNTP's; 1,5mM de MgCl₂; 10pmol de cada oligonucleotídeo iniciador p11 e p12, 5% (v/v) de DMSO, 2U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Fermentas) e água MilliQ[®] q.s.p 100μL. O programa utilizado para esta reação constou de 1 ciclo de 2 minutos a 94°C para desnaturação inicial do DNA molde e 35 ciclos de 20 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 57°C (anelamento) e 30 segundos a 72°C (extensão).

O produto desta reação foi clonado TA em vetor pTZ57R/T (Fermentas), que possui a sequência para a amplificação a partir dos oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluoróforo.

3.18.2 Ensaio de retardamento de banda em gel

O ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada ao DNA foi realizado por retardamento de banda em gel de poli-acrilamida nativo. A reação de ligação continha 0,1μM de DNA marcado com fluoróforo (região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*), tampão de ligação (10mM Tris-Acetato pH 8,0; 8mM MgCl₂; 10mM Acetato de potássio; 1mM DTT e 3,5% (p/v) PEG 8000) e concentrações crescentes de proteína em um volume final de 15μL. Esta reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) e então foram adicionados 5μL de uma solução de glicerol 15% e azul de bromofenol para a visualização da corrida no gel. A análise da ligação foi feita em gel de poli-acrilamida 4% em tampão tris-glicina com 8mM de MgCl₂. A eletroforese foi realizada a 60V por 4 horas a 4°C.

Para a realização dos ensaios de competição de ligação da proteína ao DNA, 0,1μM de DNA marcado com fluoróforo foi incubado com 3,2μM da proteína His-NifA N-truncada

purificada (quantidade de proteína necessária para se ligar a todo o DNA marcado presente na reação) e com concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado com fluoróforo ou com concentrações crescentes de DNA heterólogo de tимо bovino na presença de tampão de ligação em um volume final de 15 μ L. A reação foi incubada e analisada como descrito para a reação de ligação anterior.

O gel foi visualizado em transiluminador e registrado por sistema de video-imagem acoplado (UVP).

3.19 Ensaio de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada

Células de *E. coli* JM109 (DE3), que não apresentam atividade de β -galactosidase, foram transformadas com o plasmídeo pRT22, que possui o gene de fusão *nifH* (*K. pneumoniae*)::*lacZ*, com os plasmídeos que contêm o gene que codifica para a proteína NifA N-truncada e/ou com os plasmídeos que contêm o gene que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA. Os pré-inóculos foram cultivados em meio mínimo NFDM adicionado de 5% de fosfato, 2% de glucose, 5% de meio LB, 20mM de NH₄Cl e antibióticos adequados a 30°C durante a noite sob agitação constante (120rpm). Os inóculos foram feitos diluindo os pré-inóculos para D.O.₆₀₀≈0,2 em NFDM contendo 5% de fosfato, 2% de glucose e na presença ou na ausência de 20mM de NH₄Cl quando se desejou medir a influência dos íons NH₄⁺ na ativação transcricional pela NifA N-truncada. Para induzir a expressão da NifA N-truncada a partir de vetores com promotor T7 foi adicionado 0,5mM IPTG. Os ensaios em anaerobiose foram realizados trocando-se o O₂ dos frascos por N₂ ou Ar. As culturas foram incubadas a 30°C por 6-7h sob agitação constante (120rpm).

3.19.1 Determinação da atividade da β -galactosidase

Os ensaios de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada foram realizados através da determinação da atividade da β -galactosidase, que foi determinada como descrito por Miller (1992). A 100 μ L das culturas foram acrescentados 900 μ L de tampão Z (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄.7H₂O, 10mM KCl, 1mM MgSO₄.7H₂O, 50mM β -mercaptoetanol e 0,0027% SDS) e 25 μ L de clorofórmio. Após agitação por 10 segundos a mistura de reação

foi incubada a 28°C por 10 minutos e a reação foi iniciada pela adição de 200µL de uma solução de *o*-nitro-fenolgalactopiranosídeo (ONPG) a 4mg/mL. A reação foi interrompida com a adição de 500µL de Na₂CO₃ 1M no momento em que se observou coloração amarela suficiente devida à formação de *o*-nitrofenol. Foi feita a leitura das absorvâncias a 420nm, 550nm, correspondentes à absorvância do *o*-nitrofenol e dos debris celulares, respectivamente, e a 600nm da cultura celular utilizada no ensaio. A atividade β-gal é dada em Unidades de β-galactosidase (ou unidades Miller) e determinada pela seguinte equação:

$$\textit{Atividade } \beta - \textit{Gal} = \frac{1000 (DO_{420} - 1,75 \cdot DO_{550})}{t \cdot V \cdot DO_{600}}$$

onde t = tempo (minutos)

V = volume de cultura (mL)

DO = densidade ótica

Uma unidade de β-galactosidase é definida como 1nmol de *o*-nitrofenol produzido por minuto por miligrama de proteína a 28°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amplificação e clonagem do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense*

A fim de se caracterizar a proteína NifA N-truncada, o gene que codifica para esta proteína foi amplificado e clonado em vetores de superexpressão. Para obter uma sequência que codifica para os domínios central+C-terminal da NifA, oligonucleotídeos iniciadores foram projetados (item 3.4) para a amplificação da região correspondente do nucleotídeo 1038 ao 2383 (Figura 4), segundo sequência do gene *nifA* de *A. brasilense* depositada no GenBank, código de acesso X60714.1.

		Início do domínio central		
	NdeI	↓	<i>primer Ab5'CCT</i>	
1037	GCC CAT ATG AAC GAC GTG GTC TGC ACC AGC CCC AAC ATG CTG GAG			1081
202	Met Asn Asp Val Val Cys Thr Ser Pro Asn Met Leu Glu			214
1082	GTG ATG GCC CAG GTC CAC CGG GTG GCG CCC TTC AAG TCC ACC GTG			1126
215	Val Met Ala Gln Val His Arg Val Ala Pro Phe Lys Ser Thr Val			229
1127	CTG ATC CGC GGC GAG AGC GGC ACC GGC AAG GAG CTG ATC GCG CGG			1171
230	Leu Ile Arg Gly Glu Ser Gly Thr Gly Lys Glu Leu Ile Ala Arg			244
1172	GCC ATC CAC AAC ATG TCG CCG CGC AAG GAC GCC CCC TTC ATC CGC			1216
245	Ala Ile His Asn Met Ser Pro Arg Lys Asp Ala Pro Phe Ile Arg			259
1217	GTG AAC TGC GCC GCC CTG CCG GAA TCG CTC CTG GAA TCG GAG CTG			1261
260	Val Asn Cys Ala Ala Leu Pro Glu Ser Leu Leu Glu Ser Glu Leu			274
1262	TTC GGC CAC GAG AAG GGC GCC TTC ACC GGC GCG CAG AAG GAC CAC			1306
275	Phe Gly His Glu Lys Gly Ala Phe Thr Gly Ala Gln Lys Asp His			289
1307	AAG GGC CGG TTC GAG CTG GCG TCG GGC GGC ACG CTG TTC CTC GAC			1351
290	Lys Gly Arg Phe Glu Leu Ala Ser Gly Gly Thr Leu Phe Leu Asp			304
1352	GAG ATC GGC GAC ATC TCG CCC AAC TTC CAG GCC AAG CTG CTG CGC			1396
305	Glu Ile Gly Asp Ile Ser Pro Asn Phe Gln Ala Lys Leu Leu Arg			319
1397	GTG CTG CAG GAG CAG GAG TTC GAG CGG GTC GGT GGG TCC AAG ACC			1441
320	Val Leu Gln Glu Gln Glu Phe Glu Arg Val Gly Gly Ser Lys Thr			334
1442	ATC AAG ACC GAC GTC CGG CTG ATC TGC GCC ACC AAC CTG AAC CTG			1486
335	Ile Lys Thr Asp Val Arg Leu Ile Cys Ala Thr Asn Leu Asn Leu			349

1487 GAG GAG GCG GTC GGC CAC GGC AAG TTC CGC GCC GAC CTG TAT TTC 1531
 350 Glu Glu Ala Val Gly His Gly Lys Phe Arg Ala Asp Leu Tyr Phe 364

 1532 CGC ATC AAC GTG GTG ACC ATC CAC CTG CCG CCG CTG CGC GAG CGC 1576
 365 Arg Ile Asn Val Val Thr Ile His Leu Pro Pro Leu Arg Glu Arg 379

 1577 CGC CAG GAC ATC GGC CCG CTG GCC CGC CAT TTC GTG GCG AAG TTC 1621
 380 Arg Gln Asp Ile Gly Pro Leu Ala Arg His Phe Val Ala Lys Phe 394

 1622 GCC AAG GAC AAC GGC ATG GCC CTC GTC ATG GAG GAC GAG GCG CTG 1666
 395 Ala Lys Asp Asn Gly Met Ala Leu Val Met Glu Asp Glu Ala Leu 409

 1667 GAG GTG CTC AAC CGC TGC ACC TGG CCC GGC AAC GTG CGC GAG CTG 1711
 410 Glu Val Leu Asn Arg Cys Thr Trp Pro Gly Asn Val Arg Glu Leu 424

 1712 GAG AAC TGT ATC GAG CGC GCG GCC ACC CAG TCG CGC GAC GGC ATC 1756
 425 Glu Asn Cys Ile Glu Arg Ala Ala Thr Gln Ser Arg Asp Gly Ile 439

 1757 ATC CGC ACC GAG TCG CTG TCC TGC AGC CTG AAC CTC TGC AAC TCC 1801
 440 Ile Arg Thr Glu Ser Leu Ser Cys Ser Leu Asn Leu Cys Asn Ser 454

 1802 TCG GTG CTG TTC CAG TAC CGC ACG TTG GGC GCG TCG GTC GGT GGC 1846
 455 Ser Val Leu Phe Gln Tyr Arg Thr Leu Gly Ala Ser Val Gly Gly 469

 1847 CTC GCC CCG TCG ATG GGG CCG GGG GCC ATC AAC CGC GTT CCT CCC 1891
 470 Leu Ala Pro Ser Met Gly Pro Gly Ala Ile Asn Arg Val Pro Pro 484

 1892 GGA CGC CCC GGC GGT CCG GCG GCG GCC AAC GCG CCG AAA ACC CCG 1936
 485 Gly Arg Pro Gly Gly Pro Ala Ala Ala Asn Ala Pro Lys Thr Pro 499

 1937 GCC ATG CCC GCC CCG GTG CCG GAA CCG GCG GGT GCC GCG GCG GCG 1981
 500 Ala Met Pro Ala Pro Val Pro Glu Pro Ala Gly Ala Ala Ala Ala 514

 1982 CGT GGC CGG CCT GCG CGT CGG GTT GTT CCG CGG CCC CTC GCC GGT 2026
 515 Arg Gly Arg Pro Ala Arg Arg Val Val Pro Arg Pro Leu Ala Gly 529

 2027 CTG CGG CGC CGC CCA GCC GGT GGT TCC GGT CCC CCT GAT CCC GCA 2071
 530 Leu Arg Arg Arg Pro Ala Gly Gly Ser Gly Pro Pro Asp Pro Ala 544

 2072 TGC CCC TGC CCG AGC CGA GCG CCC CTG CCG CCG CAG GCC CCG CCC 2116
 545 Cys Pro Cys Pro Ser Arg Ala Pro Leu Pro Pro Gln Ala Pro Pro 559

 2117 CCC TCC CCT GCC GCC GCT CCG CCG CCC GCC GCG GAG GTG CCG CTG 2161
 560 Pro Ser Pro Ala Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ala Glu Val Pro Leu 574

 2162 GAC GAG CCG GAG TCG GGA TCG CTG CGC GAT CGC CTG CTC TGG GCG 2206
 575 Asp Glu Pro Glu Ser Gly Ser Leu Arg Asp Arg Leu Leu Trp Ala 589

 2207 ATG GAG CGC ACC GGC TGG GTG CAG GCC AAG GCC GCC CGC CTG CTG 2251
 590 Met Glu Arg Thr Gly Trp Val Gln Ala Lys Ala Ala Arg Leu Leu 604

 2252 GGC ATG ACG ACC CGT CAG GTC AGC TAC GCC CTG CGC AAA TAC AAC 2296
 605 Gly Met Thr Thr Arg Gln Val Ser Tyr Ala Leu Arg Lys Tyr Asn 619

2297 ATC GAG ATC AAG CGC TTC TGA GGG ACG GGC GAC AGC ATG GCC GAT 2341
 620 Ile Glu Ile Lys Arg Phe End 625

2342 CAG TAA CGG GCG GCC AAA CCG ATC ATG TAC GCG CGA TCC ACC GGC 2386
TAG TAC ATG CGC CCT AGG TGG
primer Ab3'CCT BamHI

Figura 4 Sequência do gene que codifica para os domínios central+C-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* (GenBank: X60714.1). Abaixo da sequência de nucleotídeos é mostrada a sequência traduzida de aminoácidos. Sublinhadas em vermelho estão as sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene e a região em que se anelam. Os nucleotídeos em azul foram trocados em relação à sequência original do gene para a inserção dos sítios de restrição (em verde). A seta indica o início do domínio central da proteína NifA.

O produto desta amplificação permitiria a expressão de uma proteína NifA sem os primeiros 201 aminoácidos, eliminando portanto o domínio N-terminal e a maior parte da região interdomínio QL, iniciando a tradução a partir do antepenúltimo aminoácido do QL.

Os primeiros ensaios de amplificação, utilizando DNA genômico de *A. brasilense* como molde, resultaram em um produto inespecífico (dados não mostrados) de tamanho próximo ao esperado, que é de 1346pb. Este produto inespecífico foi clonado e parcialmente sequenciado, quando se confirmou que não se tratava do gene *nifA*, e sim de uma ORF hipotética do genoma de *A. brasilense*.

O genoma de *A. brasilense* apresenta um alto conteúdo de bases G e C (>60%) dificultando a amplificação de genes. Assim, optou-se por utilizar como DNA molde um plasmídeo contendo o gene *nifA*, a fim de diminuir a possibilidade de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a regiões inespecíficas e também a formação de grampos no DNA.

Os ensaios de amplificação seguintes foram realizados utilizando como DNA molde o plasmídeo pLAnifApET (ARAÚJO, 2008), porém resultaram na amplificação de vários produtos inespecíficos (dados não mostrados). A partir de então foi utilizado como DNA molde o plasmídeo pML2A (ISHIDA, 1996), que contém o gene *nifA* inteiro. Foram necessárias, no entanto, outras modificações a fim de obter produto desejado. A amplificação de produtos inespecíficos e o baixo rendimento de reações de PCR são problemas frequentes em casos de DNA's com alto conteúdo de bases G e C (VARADARAJ e SKINNER, 1994;

MCDOWELL; BURNS; PARKES, 1998). DNA's molde com regiões de alto conteúdo GC formam *loop* no DNA gerando estruturas secundárias que promovem um salto da polimerase durante a amplificação. Este salto produz produtos de PCR menores devido a não amplificação da região do DNA molde em que se formou o *loop* (VISWANATHAN, V. K.; KRUMARIK, K.; CIANCOTTI, N. P., 1999). Alguns métodos são descritos para a melhora no rendimento e na especificidade da reação de PCR, como a adição de certos compostos orgânicos à mistura de reação, como DMSO, betaína, polietilenoglicol, glicerol e formamida (CHAKRABARTI e SCHUTT, 2001). Kitade et al. (2003) testaram a capacidade do DMSO em melhorar a reação de PCR utilizando genes de *Porphyra yezoensis* como molde, contendo alto conteúdo GC (média de 68,4%). Eles observaram que a eficiência e a especificidade da amplificação muda de acordo com a concentração de DMSO adicionada. Em outro estudo Kang; Lee e Gorenstein (2005) testaram a utilização de betaína e DMSO isolados ou em conjunto na reação de PCR contendo como DNA molde moléculas que formam estruturas secundárias estáveis, e por isso geram produtos de amplificação menores e inespecíficos. Tanto a betaína quanto o DMSO isolados foram capazes de melhorar o PCR aumentando a taxa de produtos de amplificação maiores em relação aos produtos menores (aumento de 30% e 120%, respectivamente), sendo que a utilização dos dois compostos em conjunto aumentou 190% a taxa de amplificação em relação à reação sem os aditivos. Em ambos os estudos o efeito mais proeminente observado com a adição de DMSO foi na concentração de 5%.

Dessa forma, como estudos anteriores mostraram a melhora na reação de PCR contendo DNA molde de alto conteúdo GC com a adição de compostos orgânicos, testamos a adição destes às reações de amplificação. Como não tínhamos à disposição betaína, testamos a utilização de DMSO na concentração de 5%. Além da adição de DMSO à reação, foi testado um sistema de amplificação contendo *Taq* DNA polimerase recombinante (Fermentas) e dois tipos de tampões à escolha: 10X *Taq*Buffer com KCl (100mM Tris-HCl pH8,8 a 25°C, 500mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40) e 10X *Taq*Buffer com (NH₄)₂SO₄ (750mM Tris-HCl pH8,8 a 25°C, 200mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% (v/v) Tween 20).

Foram testadas quatro condições, na presença e na ausência de DMSO utilizando tampão com KCl, e na presença e na ausência de DMSO utilizando tampão com (NH₄)₂SO₄. O tampão contendo KCl é o tampão tradicional, mais comumente utilizado, enquanto que o tampão com (NH₄)₂SO₄ permite maior rendimento de produtos específicos de PCR na presença de diversas concentrações de MgCl₂. Íons Mg²⁺ estabilizam o complexo *primer-DNA* molde, enquanto que íons NH₄⁺ têm o efeito contrário de desestabilização,

especialmente em ligações fracas de pontes de hidrogênio entre *primer*-DNA molde erroneamente pareados. Devido a este efeito antagonista entre Mg^{2+} e NH_4^+ , o tampão com $(NH_4)_2SO_4$ oferece maior especificidade de anelamento dos *primers* em concentrações variadas de $MgCl_2$ e em diversas temperaturas de anelamento.

De fato, apenas houve amplificação na presença de DMSO na reação contendo tampão com $(NH_4)_2SO_4$ (Figura 5). A eletroforese em agarose do produto desta reação revelou um fragmento de aproximadamente 1,3Kpb. Nesta reação foi utilizado um gradiente de temperatura para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores que variou de 52°C a 60°C. A Figura 5 mostra que houve amplificação nas quatro temperaturas testadas.

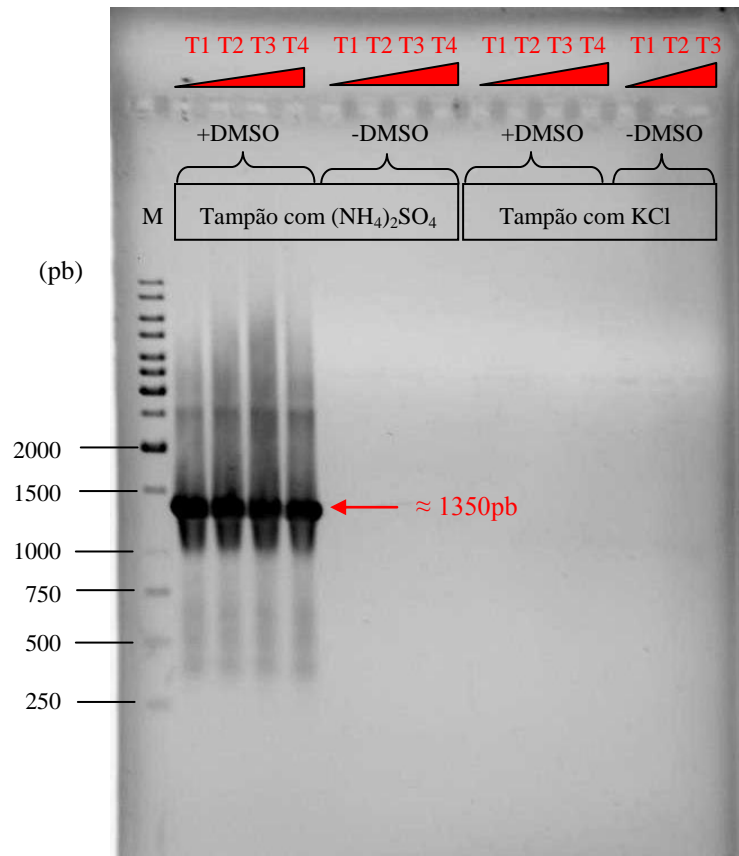
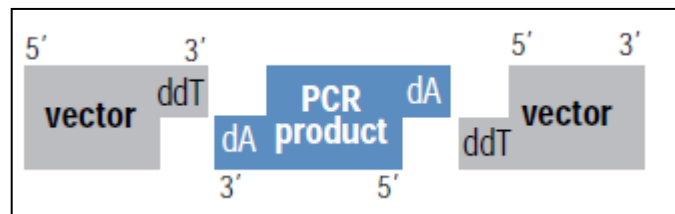


Figura 5 Eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE1X dos produtos de amplificação do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* obtidos a diferentes temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores. As reações de amplificação do DNA foram realizadas como descrito em Material e Métodos (item 3.4). O DNA foi corado com brometo de etídio. O produto da amplificação obtido está indicado pela seta vermelha. M: marcador 1Kb DNA ladder (Fermentas). As amplificações foram testadas com dois tipos de tampão (com $(NH_4)_2SO_4$ e com KCl) e na presença ou ausência de DMSO. As reações de PCR foram testadas com gradiente de temperatura crescente a T1=52,7°C, T2= 55,4°C, T3= 58,1°C e T4=60,4°C.

O produto da amplificação obtido à maior temperatura de anelamento (60,4°C) foi utilizado para clonagem em vetor de ligação pTZ57R/T utilizando “kit” de clonagem InsTAclone (Fermentas), gerando o plasmídeo pCN57RCCT. Este “kit” utiliza um sistema TA para clonagem direta de produtos de PCR que apresentam extremidade 3’ com nucleotídeos adenina despareados, que são gerados pela Taq DNA polimerase devido à sua atividade de transferase terminal. A estrutura destes produtos de PCR favorece a clonagem direta a vetores linearizados que contêm extremidade T protuberante na ponta 3’, complementar ao produto de PCR (Figura 6).



Fonte: InsTAclone[®]PCR Cloning Kit (Fermentas)

Figura 6 Sistema de clonagem TA. Os produtos de PCR gerados pela Taq DNA polimerase possuem extremidade A complementares às extremidades T dos vetores TA, como o pTZ57R/T (Fermentas).

Após transformação da ligação, quinze colônias foram analisadas por Rapidprep (item 3.12), onde os clones são avaliados pela migração em gel de agarose em relação ao vetor sem inserto (Figura 7). Os clones 1, 3, 4, 7, 8, 9 e 13 foram escolhidos para confirmação da inserção do fragmento amplificado por padrão de restrição. Foram utilizadas duas enzimas de restrição para esta análise. A primeira foi a EcoRI, que apenas lineariza o vetor. Se o vetor contiver o inserto, o fragmento terá um tamanho de 4232pb (Figura 8). A segunda enzima de restrição utilizada foi a PstI, que cliva o inserto em duas regiões e o vetor em uma. Caso o inserto esteja ligado ao vetor, haverá a liberação de 3 fragmentos: 377pb, 620pb e 3253pb (Figura 9A) ou 377pb, 367pb e 3488pb (Figura 9B), dependendo da orientação em que houve a ligação do inserto ao vetor. Na ausência do inserto o plasmídeo linearizado apresentará tamanho de 2886pb. O plasmídeo pML2A também foi submetido a restrição com a enzima EcoRI, o qual deveria liberar dois fragmentos de aproximadamente 4800pb e 300pb. A Figura 10 indica que apenas o clone 7, como era esperado pelo padrão observado na análise por Rapidprep, não possui inserto. Os demais apresentam o primeiro padrão de restrição descrito para a enzima PstI, indicando a presença do fragmento de interesse.

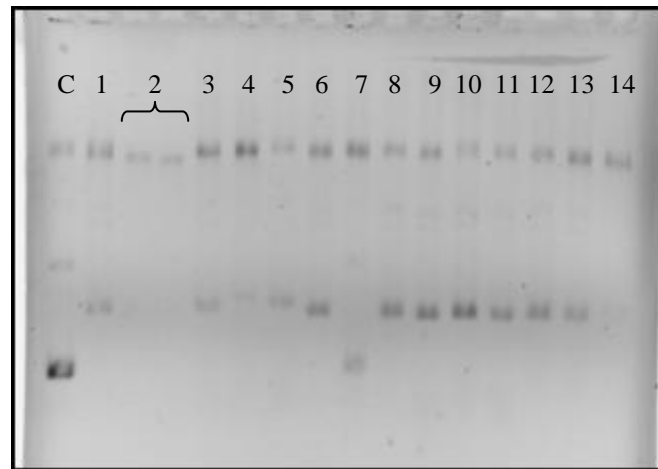


Figura 7 Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE1X de DNA obtido de clones transformados e resistentes a Amp. Os plasmídeos recombinantes foram isolados pela técnica de Rapidprep como descrito em Material e Métodos (item 3.12). O DNA foi corado com brometo de etídio. C: vetor controle pTZ57R/T sem inserto. Colunas 1-15: clones 1-15. Os clones 1, 3, 4, 7, 8, 9 e 13 foram escolhidos para análise por reação de restrição.

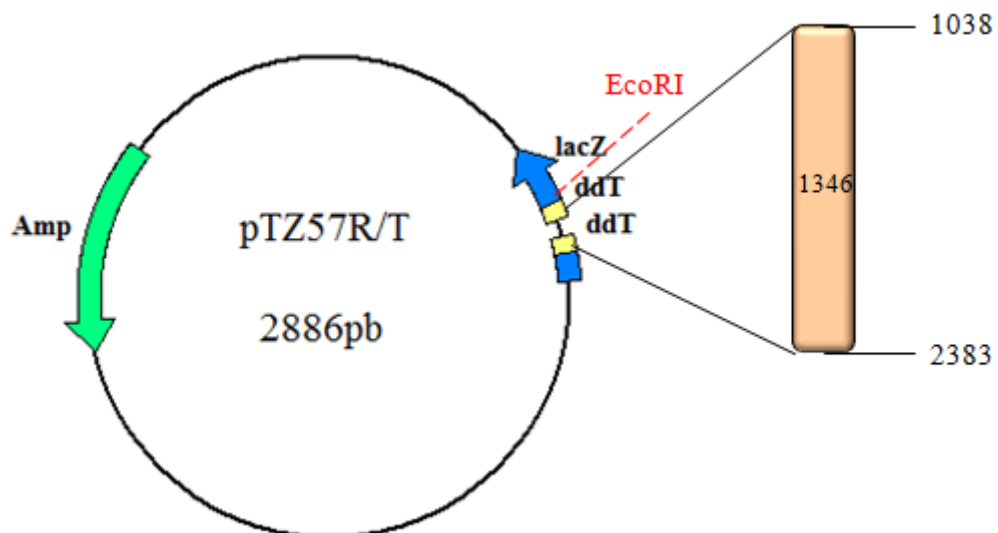


Figura 8 Esquema do clone em pTZ57R/T digerido com a enzima EcoRI. O fragmento inserido no vetor contém 1346 pares de bases correspondentes à região do nucleotídeo 1038 ao 2383 (GenBank: X60714.1). O sítio de clivagem da enzima EcoRI está indicado em vermelho. A digestão com esta enzima lineariza o plasmídeo gerando um fragmento de 4232pb.

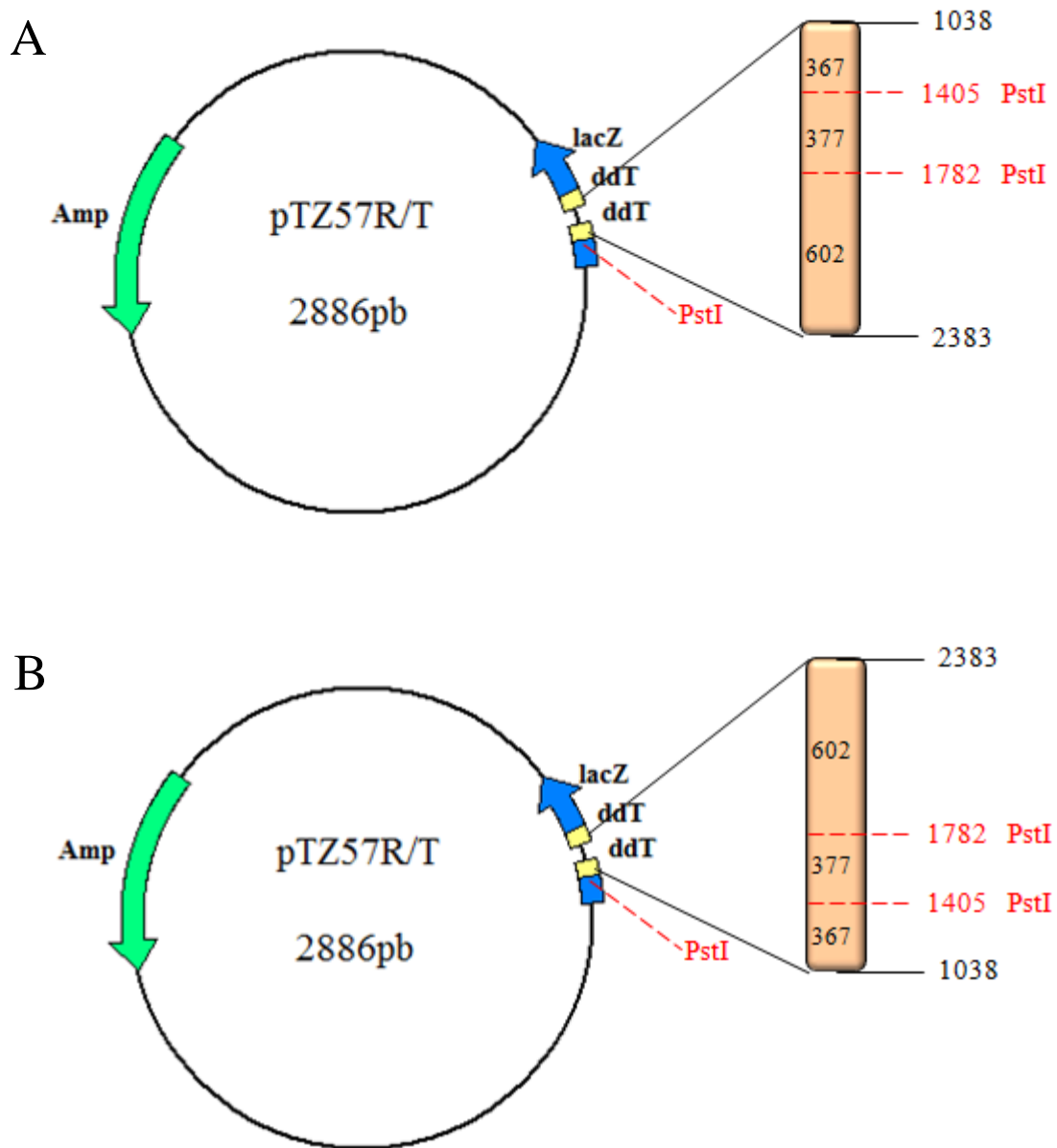


Figura 9 Esquema do clone em pTZ57R/T digerido com a enzima PstI. O fragmento inserido no vetor contém 1346 pares de bases correspondentes à região do nucleotídeo 1038 ao 2383 (GenBank: X60714.1). Os sítios de clivagem da enzima PstI estão indicados em vermelho. A digestão com esta enzima libera 3 fragmentos de 377pb, 620pb e 3253pb (A) ou 377pb, 367pb e 3488pb (B), dependendo a orientação em que o inserto se ligou ao vetor.

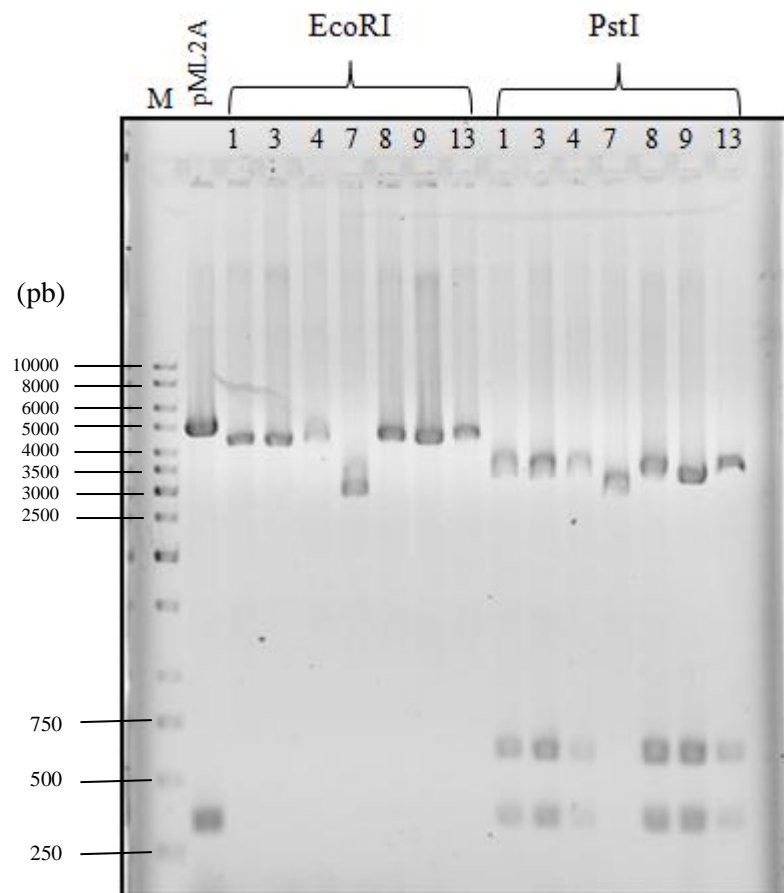


Figura 10 Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE1X da análise da restrição dos clones. O gel foi corado com brometo de etídio. M: marcador 1Kb DNA ladder (Fermentas) em pb. O plasmídeo pML2A foi clivado com a enzima EcoRI. Os clones 1, 3, 4, 7, 8, 9, e 13 foram clivados com as enzimas EcoRI e PstI.

O inserto foi também sequenciado em 80% de sua extensão para confirmação de que se trata do gene da *nifA*. As regiões conservadas de cisteínas e hélice-volta-hélice de ligação ao DNA foram sequenciadas. A região não sequenciada corresponde ao final da região interdomínios IDL e início do domínio C-terminal (Figura 11).

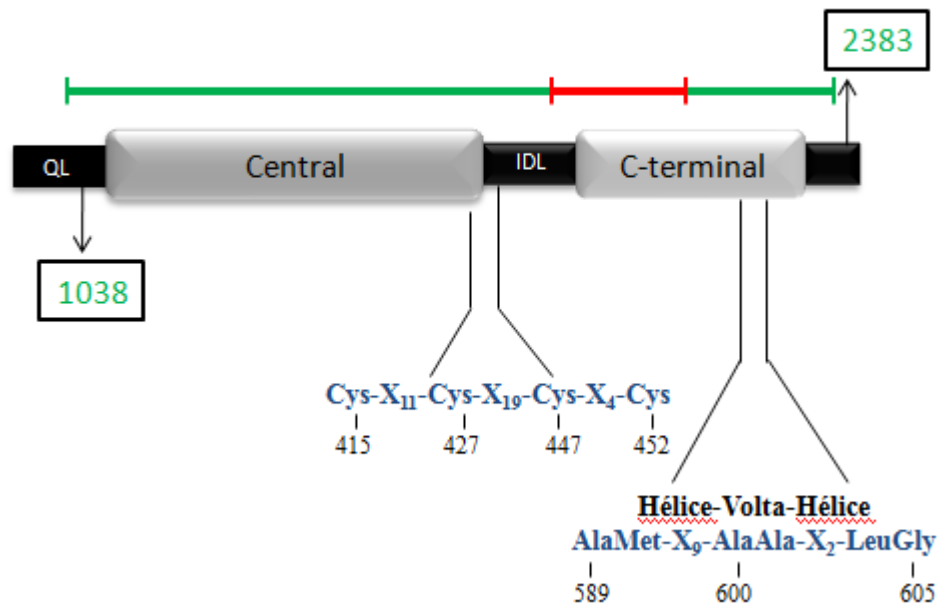


Figura 11 Modelo esquemático da região do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada que foi sequenciada. Aproximadamente 80% do fragmento amplificado foi confirmado por sequenciamento. A linha em verde indica a região sequenciada e a linha em vermelho a não sequenciada. Em azul estão indicadas as regiões conservadas de cisteínas e hélice-volta-hélice. Os números em verde indicam os nucleotídeos correspondentes ao início e ao fim do gene amplificado (GenBank: X60714.1) e em preto a posição dos aminoácidos na proteína NifA.

O gene que codifica para a proteína NifA N-truncada foi posteriormente sub-clonado nos vetores de expressão pET28a, pT7-7, pDK5, pDK6 e pDK7, gerando os plasmídeos recombinantes pCNpETCCT, pCNT7CCT (Figura 12), pCNK5CCT, pCNK6CCT e pCNK7CCT (Figura 13). Os plasmídeos pET28a e pT7-7 foram escolhidos por possuírem promotor T7, possibilitando alto nível de expressão da proteína, sendo que o vetor pET28a expressa a proteína fusionada a seis histidinas, facilitando o processo de purificação por cromatografia de afinidade, e o vetor pT7-7 expressa a proteína nativa. Os demais plasmídeos (pDK5, pDK6 e pDK7) possuem promotor *tac* e por isso um nível de expressão protéico menor que o promotor T7, dessa forma aproximam-se mais dos níveis fisiológicos da bactéria hospedeira para a realização de ensaios *in vivo*. Foi utilizado também o promotor *lac* para a expressão do domínio N-terminal (pCN18RNT – Apêndice A) em um ensaio de controle da ativação transcricional. Este promotor possui um nível de expressão da proteína menor em relação aos demais promotores utilizados.

A sequência teórica do gene que codifica para a proteína His-NifA N-truncada foi traduzida pelo programa BioEdit e a sequência de proteína analisada pela ferramenta

ProtParam do ExPASy (**Expert Protein Analysis System**) Proteomics Server. Este servidor pertence ao Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) e dedica-se à análise de sequências e estruturas de proteínas. De acordo com esta ferramenta, a proteína a ser expressa e purificada possui 444 aminoácidos, massa molecular de 47.918Da e um pI teórico de 9,60.

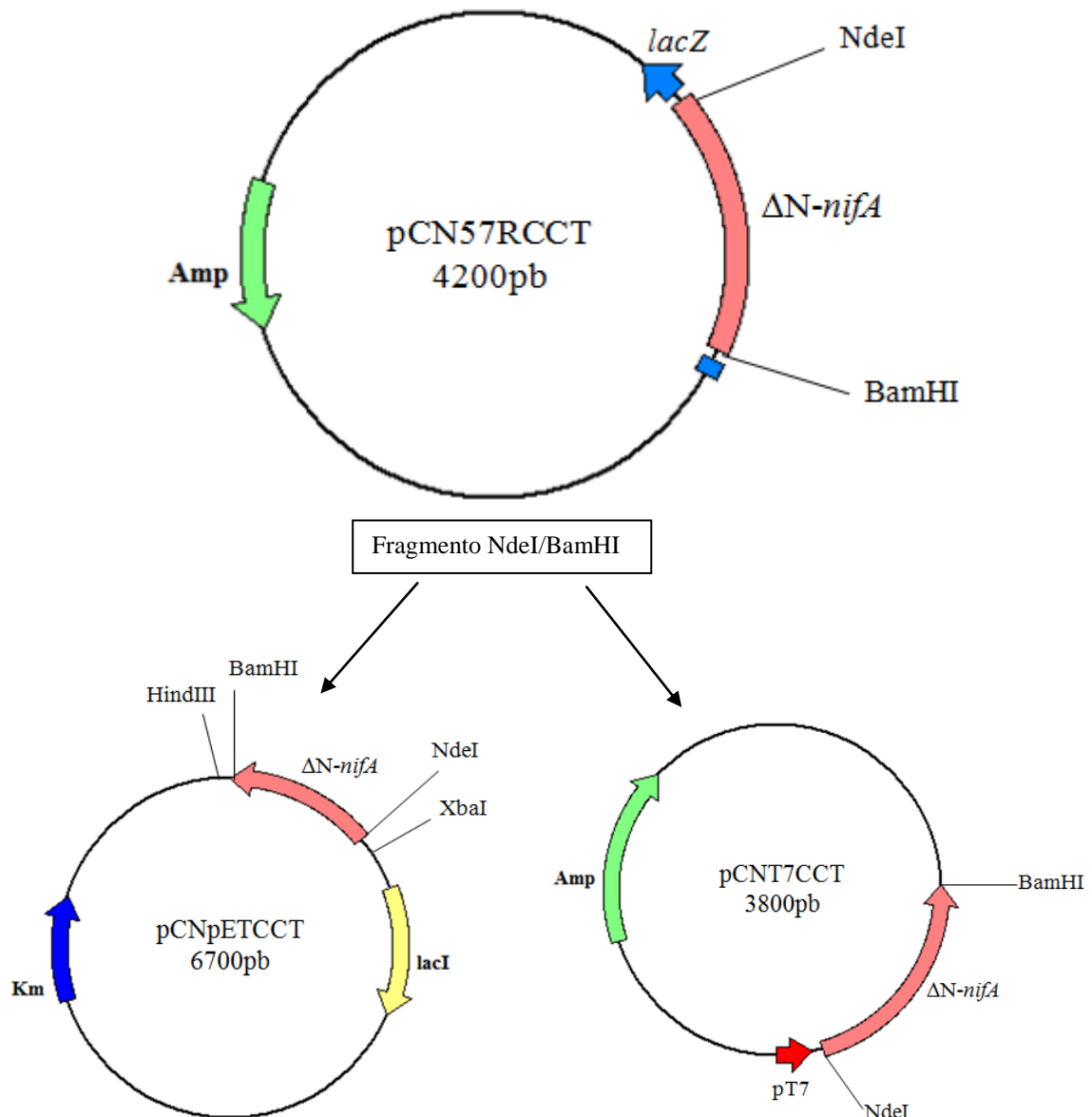


Figura 12 Estratégia de clonagem do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada nos vetores de expressão pET28a e pT7-7. O gene que codifica para a proteína NifA N-truncada foi inicialmente clonado TA em vetor pTZ57R/T gerando o plasmídeo pCN57RCCT. Este plasmídeo foi digerido com as enzimas NdeI e BamHI, liberando o inserto, que foi clonado nos vetores pET28a e pT7-7 gerando os plasmídeos pCNpETCCT e pCNT7CCT, respectivamente.

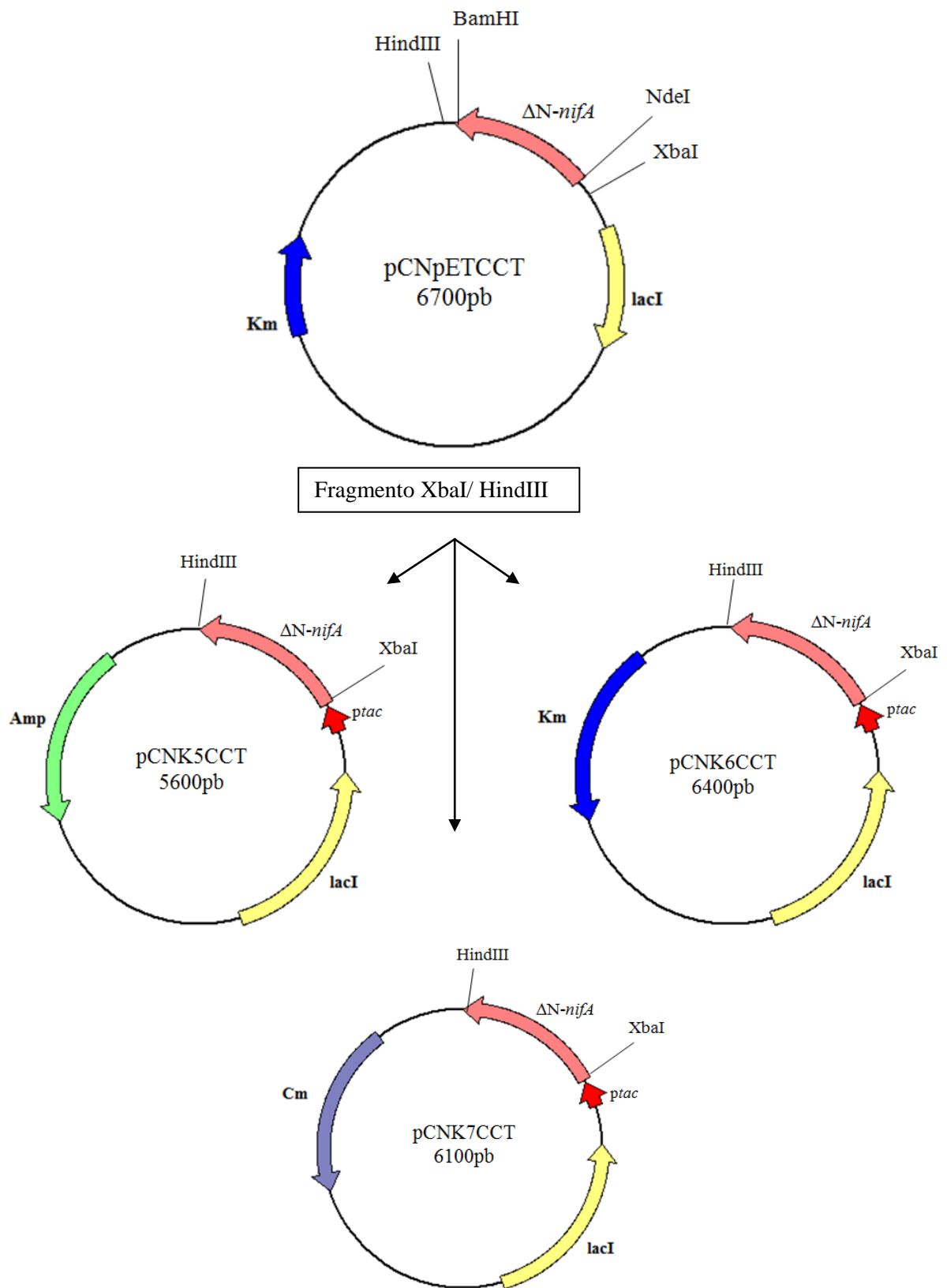


Figura 13 Estratégia de clonagem do gene que codifica para a proteína NifA N-truncada nos vetores de expressão pDK5, pDK6 e pDK7. O plasmídeo pCNpETCCT foi clivado com as enzimas XbaI e HindIII. O inserto liberado foi clonado nos vetores pDK5, pDK6 e pDK7 gerando os plasmídeos pCNK5CCT, pCNK6CCT e pCNK7CCT.

4.2 Expressão e purificação da proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense* em *E. coli*

Para a expressão da proteína recombinante His-NifA N-truncada, o plasmídeo pCNpETCCT foi transformado por eletroporação em *E. coli* estirpe BL21 (DE3) como descrito em Material e Métodos (item 3.13). Esta estirpe é capaz de expressar genes a partir do promotor do fago T7, para tanto, a expressão da RNA polimerase do fago T7 ocorre via indução com IPTG.

O vetor pET28a, no qual foi sub-clonado o gene que codifica para a NifA N-truncada, expressa a proteína fusionada a uma cauda com seis resíduos de histidinas (cauda His) na porção N-terminal. A proteína expressa foi então denominada His-NifA N-truncada. A presença de uma cauda His facilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em coluna contendo metal de transição. Neste trabalho utilizamos colunas pré-empacotadas HiTrap Chelating carregada com íons Ni^{2+} . Estas colunas possuem matriz de agarose acoplada a ácido iminodiacético. Quando carregada com íons metálicos adequados (normalmente Ni^{2+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+}) a proteína fica retida na coluna devido à propriedade de alguns aminoácidos, como a histidina, se complexarem com íons metálicos.

A expressão da proteína His-NifA N-truncada foi realizada incubando-se 300mL de uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3), transformada com o plasmídeo pCNpETCCT, a 30°C até atingir $\text{D.O.}_{600} \approx 0,5$. Neste momento foi adicionado 0,5mM IPTG e a cultura incubada a 18°C por aproximadamente 16h (item 3.15). A indução da expressão da proteína a temperaturas menores faz com que esta seja expressa mais lentamente, fato que pode auxiliar no enovelamento correto da proteína e melhorar a sua solubilidade. Sob essas condições aproximadamente 50% da proteína permaneceram na fração solúvel, que foi utilizada para a purificação em coluna HiTrap Chelating Ni^{2+} (item 3.16.1). As proteínas retidas na coluna foram eluídas por um gradiente crescente de imidazol (50mM a 1M), sendo que a proteína de interesse foi eluída principalmente no gradiente de 300mM de imidazol (Figura 14). A eluição da proteína em concentrações baixas de imidazol acarretou a eluição conjunta de proteínas contaminantes, que são normalmente eluídas nos gradientes iniciais. Devido à presença destes contaminantes a pureza da amostra obtida nesta coluna foi de 49% (Tabela 6).

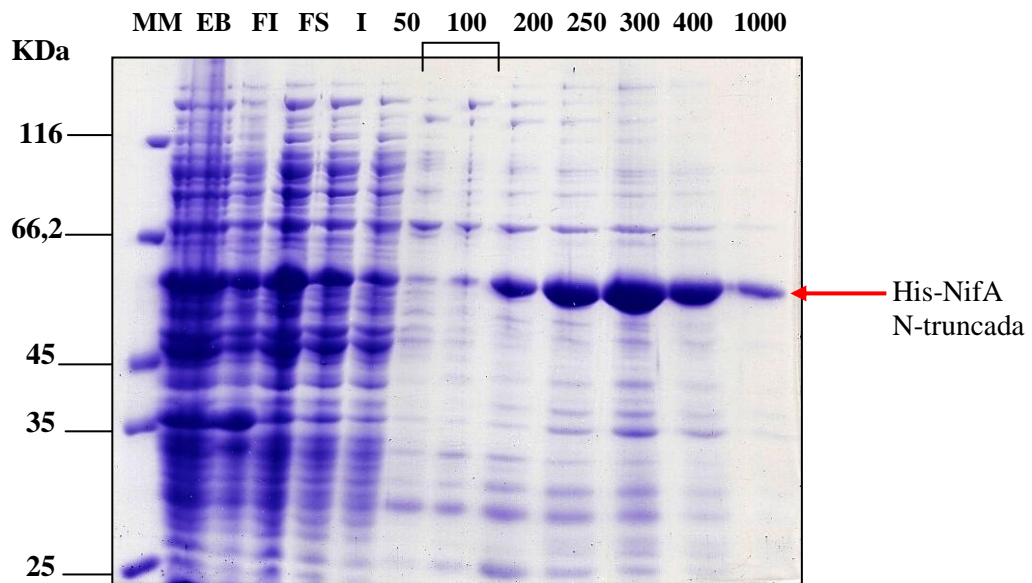


Figura 14 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% das frações protéicas obtidas durante a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Chelating Ni²⁺ (GE Healthcare). A proteína His-NifA N-truncada foi expressa e purificada como descrito em Material e Métodos item 3.16. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250. MM: Marcador molecular de proteína (Fermentas). EB: Extrato bruto. FI: Fração insolúvel do extrato celular. FS: Fração solúvel do extrato celular. I: Fração da amostra que não se ligou à coluna. As proteínas foram eluídas com 50, 100, 200, 250, 300, 400 e 1000mM de imidazol. A seta indica a proteína His-NifA N-truncada, de aproximadamente 48kDa.

Visando à melhora na purificação da proteína His-NifA N-truncada, as frações foram cromatografadas em coluna HiTrap Heparin, como descrito em Material e Métodos (item 3.16.2). A heparina é uma glucosaminoglicana sulfatada e está ligada covalentemente a uma matriz de agarose nesta coluna. Esta heparina imobilizada possui duas formas de interação com as proteínas: pode atuar como ligante por afinidade, através da sua interação com proteínas que se ligam ao DNA, ou servir como uma trocadora catiônica, devido à presença de seus grupos sulfatados. No caso da NifA, por ela ser uma ativadora transcricional, acredita-se que ela se ligue à heparina por afinidade.

Para purificação nesta coluna, juntaram-se as frações eluídas a 250mM e a 300mM de imidazol. Estas frações foram escolhidas por serem as que apresentaram maior quantidade da proteína de interesse e também de contaminantes. As frações agrupadas, antes de serem passadas pela coluna de heparina, foram diluídas na proporção 1:1 para diminuir a concentração inicial de NaCl, pois os tampões da purificação anterior continham 500mM NaCl e não sabíamos a concentração na qual a proteína seria eluída da coluna.

A proteína His-NifA N-truncada foi eluída com 700mM NaCl (Figura 15) e, apesar do baixo rendimento da purificação, esta última etapa foi eficiente por aumentar o grau de pureza da amostra para 80% (Tabela 6). Como para a realização do ensaio de ativação transcricional não eram necessárias grandes quantidades de proteína e sim era desejada maior pureza, esta purificação foi considerada satisfatória. A proteína foi purificada com 80% de pureza e concentração de 0,25mg/mL (Tabela 6).

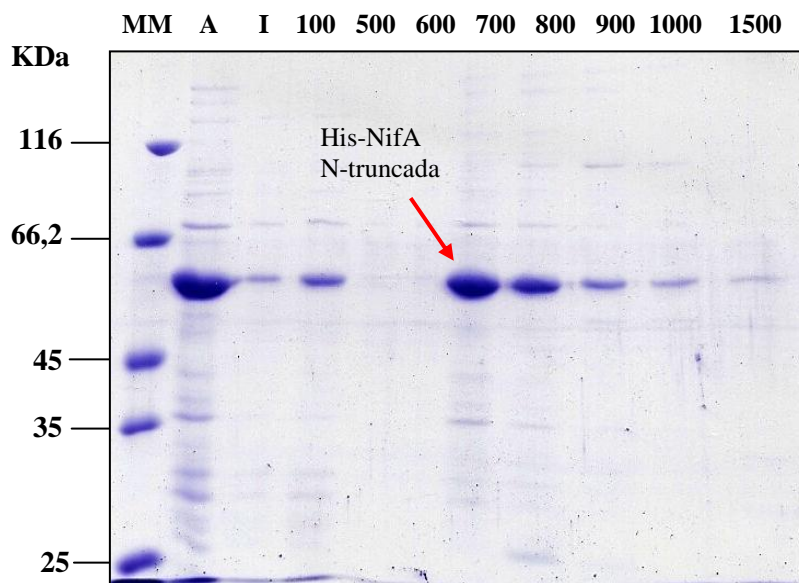


Figura 15 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% das frações protéicas obtidas durante a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Heparin (GE Healthcare). A proteína His-NifA N-truncada foi expressa e purificada como descrito em Material e Métodos item 3.16. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250. MM: Marcador molecular de proteína (Fermentas). A: Amostra antes de ser aplicada na coluna HiTrap Heparin. I: Fração da amostra que não se ligou à coluna. As proteínas foram eluídas com 100, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 e 1500mM NaCl. A seta indica a proteína His-NifA N-truncada, de aproximadamente 48kDa.

Às frações eluídas a 700mM e a 800mM de NaCl foi adicionado glicerol a uma concentração final de 15%. Estas frações foram armazenadas em alíquotas de 200 μ L a -70°C. Uma alíquota da fração eluída a 700mM de NaCl foi mantida em gelo e a 4°C para a realização do ensaio de ligação da proteína ao DNA.

Tabela 6 - Tabela de purificação da proteína His-NifA N-truncada expressa em *E. coli* BL21(DE3)

Etapas	Proteína Total (mg)	Pureza (%)	Rendimento (%)
Extrato bruto	102	-	-
Fração solúvel	48	-	100
HiTrap Chelating Ni²⁺	1,10	49	2,3
HiTrap Heparin	0,13	80	0,27

Tabela de purificação da proteína His-NifA N-truncada expressa em *E. coli* BL21 (DE3). As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford como descrito em Material e Métodos item 3.17. A pureza da amostra foi determinada por análise densitométrica das bandas de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue R-250.

4.3 Ensaio *in vitro* de atividade de ligação da proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense* à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*

O domínio carboxi-terminal da proteína NifA apresenta um motivo hélice-volta-hélice conservado responsável pela ligação da proteína ao sítio UAS presente na região promotora dos genes *nif* (MORETT; CANNON; BUCK, 1988). A fim de se verificar a atividade da proteína purificada, a His-NifA N-truncada foi testada quanto à sua capacidade de ligação à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

Para a realização deste ensaio, a região promotora do gene *nifB* foi amplificada utilizando oligonucleotídeos iniciadores marcados com os fluoróforos VIC e FAM, sendo o ensaio realizado como descrito em Material e Métodos (itens 3.18.1 e 3.18.2, respectivamente). Neste ensaio, 0,038 μ M de DNA correspondente à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi incubado com concentrações crescentes de proteína, que variaram de 0,16 a 3,2 μ M (concentração calculada considerando a proteína NifA como um monômero) (Figura 16). No ensaio é possível observar o aparecimento de uma banda de migração mais lenta na medida em que são adicionadas concentrações crescentes de proteína His-NifA N-truncada. A partir da presença de 0,4 μ M de proteína observa-se o aparecimento repetido de uma banda de migração mais lenta, e na presença de 3,2 μ M da proteína His-NifA N-truncada há o desaparecimento da banda de DNA livre. Essa diferença de migração está provavelmente relacionada à formação do complexo de DNA ligado à proteína His-NifA N-truncada que, com maior massa molecular, migra mais lentamente no gel em relação ao DNA

livre. Esses resultados indicam que a proteína His-NifA N-truncada purificada é capaz de se ligar à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

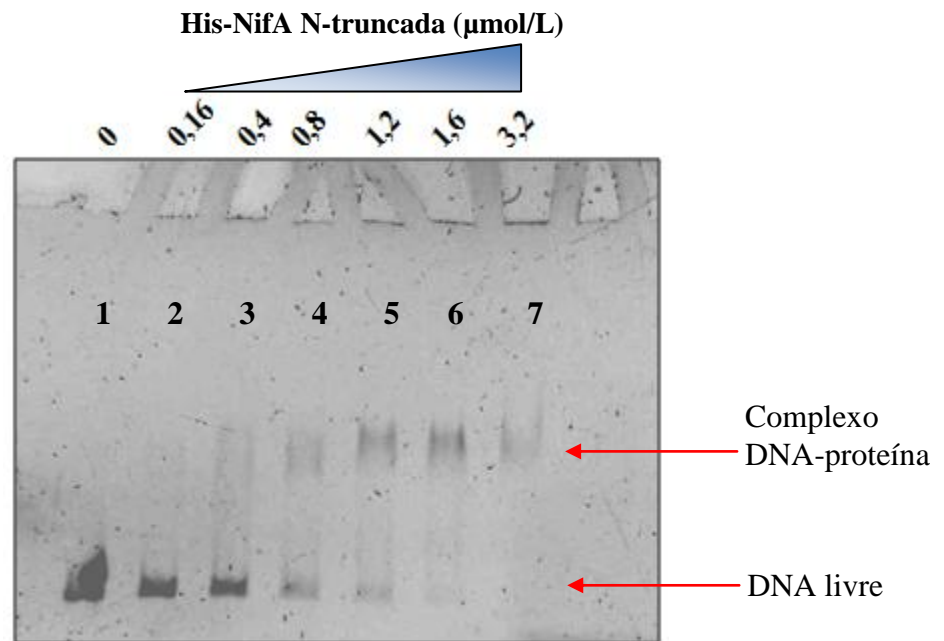


Figura 16 Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*. Gel de poliacrilamida não desnaturante 4% em tampão Tris-Glicina com 8mM MgCl₂. Concentrações crescentes de proteína His-NifA N-truncada foram incubadas com a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* (0,038µM) como descrito em Material e Métodos (item 3.18). Coluna 1: DNA correspondente à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* marcado com fluoróforo na ausência da proteína. Colunas 2-7: promotor *nifB* incubado com concentrações indicadas de His-NifA N-truncada. O DNA foi visualizado utilizando sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

Para se verificar a especificidade da ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foram realizados ensaios de competição com DNA homólogo não marcado com fluoróforo. Neste ensaio 0,038µM de DNA correspondente ao promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae* marcado foi incubado com 3,2µM de His-NifA N-truncada, quantidade necessária para se ligar a todo DNA marcado presente na reação, na presença de concentrações crescentes de *nifB* não marcado com fluoróforo (0,019 a 0,114µM). O resultado está apresentado na Figura 17. Como pode ser observado, nas menores concentrações do DNA homólogo competidor é possível visualizar que não existe banda correspondente ao DNA livre marcado. Neste experimento, o complexo

DNA-proteína permaneceu no poço do gel como indicado pelo sinal de fluorescência. Em concentrações mais elevadas (a partir de 0,095 μM) de DNA homólogo não marcado pode ser observado o desaparecimento do sinal de fluorescência no poço do gel e o aparecimento da banda correspondente ao DNA livre. A concentração de 0,095 μM corresponde a uma relação de 2,5 entre DNA não marcado que DNA marcado. Não é clara a razão pela qual o complexo DNA-proteína não penetrou na malha do gel permanecendo no poço.

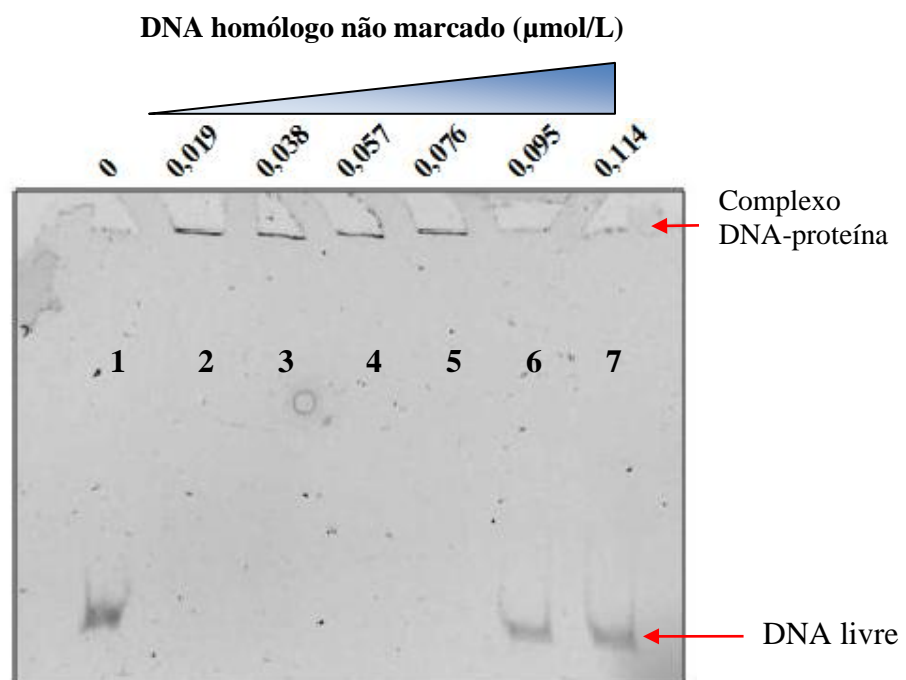


Figura 17 Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* na presença de diferentes concentrações de DNA homólogo não marcado. Gel de poliacrilamida não desnaturalante 4% em tampão Tris-Glicina com 8mM MgCl_2 . O DNA correspondente à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* marcado com fluoróforo (0,038 μM) foi incubado com 3,2 μM de His-NifA N-truncada na presença de concentrações indicadas de DNA homólogo não marcado, como descrito em Material e Métodos (item 3.18). Coluna 1: DNA correspondente à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* marcado com fluoróforo na ausência de proteína. Colunas 2-7: promotor *nifB* (0,038 μM) com 3,2 μM de His-NifA N-truncada e concentrações indicadas de DNA homólogo não marcado. As setas indicam o DNA livre e o complexo DNA-proteína. O DNA marcado foi visualizado utilizando sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

O ensaio de ligação ao DNA da proteína His-NifA-N-truncada também foi realizado na presença de DNA heterólogo (DNA de timo bovino). Neste ensaio 0,038 μM (120ng) de DNA marcado e 3,2 μM de proteína His-NifA N-truncada foram utilizados na presença de concentrações crescentes de DNA de timo bovino (25 a 650ng). Os resultados são

apresentados na Figura 18. Em concentrações inferiores a 250 ng de DNA de timo bovino, é observada a banda correspondente ao complexo DNA-proteína com menor taxa de migração. Entretanto, com o aumento da concentração de DNA de timo, observa-se uma menor proporção do complexo DNA-proteína, indicando desligamento da proteína do DNA marcado ou a não formação deste complexo. Em concentrações superiores a 500ng é visível que parte do DNA marcado encontra-se na forma livre. A utilização de DNA de timo bovino em experimentos de formação de complexo DNA-proteína é regularmente utilizada para indicar especificidade da ligação. Nossos resultados mostram que a proteína His-NifA-N-truncada purificada é capaz de se ligar ao DNA (formação do complexo DNA-proteína), entretanto, esta ligação parece não ser altamente específica uma vez que sofre interferência pela presença de DNA de timo. Alguns fatores podem ter contribuído para essa menor especificidade e podem indicar que a proteína purificada não está numa conformação adequada.

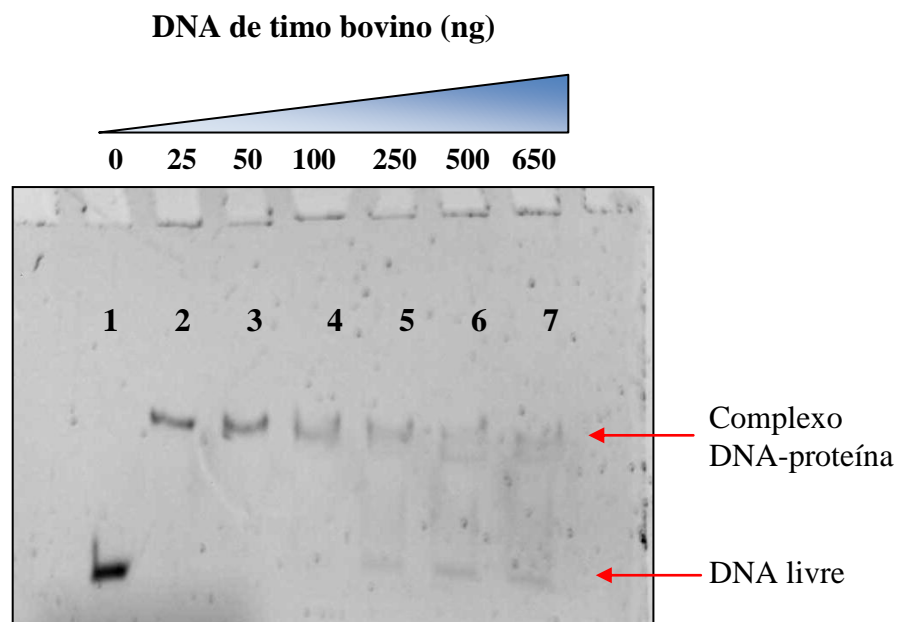


Figura 18 Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* na presença de diferentes concentrações de DNA de timo bovino. Gel de poliacrilamida não desnaturante 4% em tampão Tris-Glicina com 8mM MgCl₂. O DNA correspondente à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* marcado com fluoróforo (0,038μM) foi incubado com 3,2μM de His-NifA N-truncada e concentrações indicadas de DNA de timo bovino, como descrito em Material e Métodos (item 3.18). Coluna 1: DNA correspondente à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* marcado com fluoróforo na ausência de proteína. Colunas 2-7: promotor *nifB* com 3,2μM de His-NifA N-truncada e concentrações indicadas de DNA de timo bovino (25 a 650ng). As setas indicam o DNA livre e o complexo DNA-proteína. O DNA foi visualizado utilizando sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

Estudos utilizando a proteína NifA purificada de *Azospirillum* em ensaios de ligação ao DNA até o momento não foram descritos. Passaglia e colaboradores (1998) realizaram ensaios de ligação ao DNA da proteína NifA de *A. brasilense* presente no extrato total de *E. coli* e observaram que ela era capaz de se ligar ao sítio UAS do promotor *nifH* de *K. pneumoniae*. Semelhante ao nosso sistema esses ensaios também foram realizados na presença de O₂. Resultados descritos por Monteiro et al. (1999) utilizando uma forma N-truncada da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* purificada e ensaiada na presença de O₂ mostraram a capacidade da proteína em ligar-se a regiões de *nifB* de *H. seropedicae* e *nifH* de *Rhizobium meliloti*. Como a sensibilidade ao oxigênio da NifA de *A. brasilense* é atribuída ao motivo conservado de cisteínas presente no interdomínio que liga os domínios central e C-terminal (FISCHER, 1994) e a capacidade de ligação ao DNA é devido ao motivo hélice-volta-hélice presente no domínio C-terminal (MORETT; CANNON; BUCK, 1988), é possível que o motivo de ligação ao DNA não sofra influência direta do O₂.

4.4 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela NifA N-truncada de *A. brasilense*

A proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* foi testada quanto a capacidade de ativar *in vivo* a transcrição do gene *nifH*. Para tanto os ensaios foram realizados utilizando uma fusão *nifH::lacZ* presente no plasmídeo pRT22 e transformado em *E. coli* estirpe JM109 (DE3). A estirpe JM109 (DE3) foi escolhida por produzir a RNA polimerase do fago T7, necessária para ativar a transcrição da proteína NifA N-truncada em alguns dos plasmídeos utilizados, e por não apresentar atividade endógena de β -galactosidase. Se a proteína NifA N-truncada expressa em *E. coli* for ativa, a ativação do promotor *nifH* levará a síntese da proteína β -galactosidase.

Os ensaios de ativação transcricional foram realizados na presença e na ausência de íons NH₄⁺ e de oxigênio, com o objetivo de verificar uma possível regulação *in trans* da proteína NifA N-truncada pelo domínio N-terminal e o controle negativo exercido pelo oxigênio. Para isso as células JM109 (DE3) contendo o plasmídeo pRT22 foram transformadas com um plasmídeo que contém o gene que codifica para o domínio N-terminal da NifA e outro com o gene que codifica para a proteína NifA N-truncada.

O domínio N-terminal em *A. brasilense* é responsável pelo controle negativo da atividade da proteína na presença de íons amônio (ARSÈNE et al., 1996). O domínio central interage com o fator σ^{54} da RNA polimerase, possui um motivo AAA de hidrólise do ATP (GONZÁLEZ et al., 1998; WALKER et al., 1982) e está ligado ao domínio C-terminal pela região interdomínio (IDL) que apresenta um motivo contendo resíduos de cisteínas, provavelmente envolvidos com a sensibilidade ao oxigênio (FISCHER, 1994). Dessa forma, espera-se que na presença de oxigênio a atividade da NifA N-truncada esteja inibida, assim como na presença do domínio N-terminal e de íons NH_4^+ , conseqüentemente não haverá a transcrição da enzima β -galactosidase. O ensaio de atividade da β -galactosidase foi realizado como descrito em Material e Métodos (item 3.19). A Figura 19 ilustra de uma forma geral como o ensaio de ativação transcricional foi realizado.

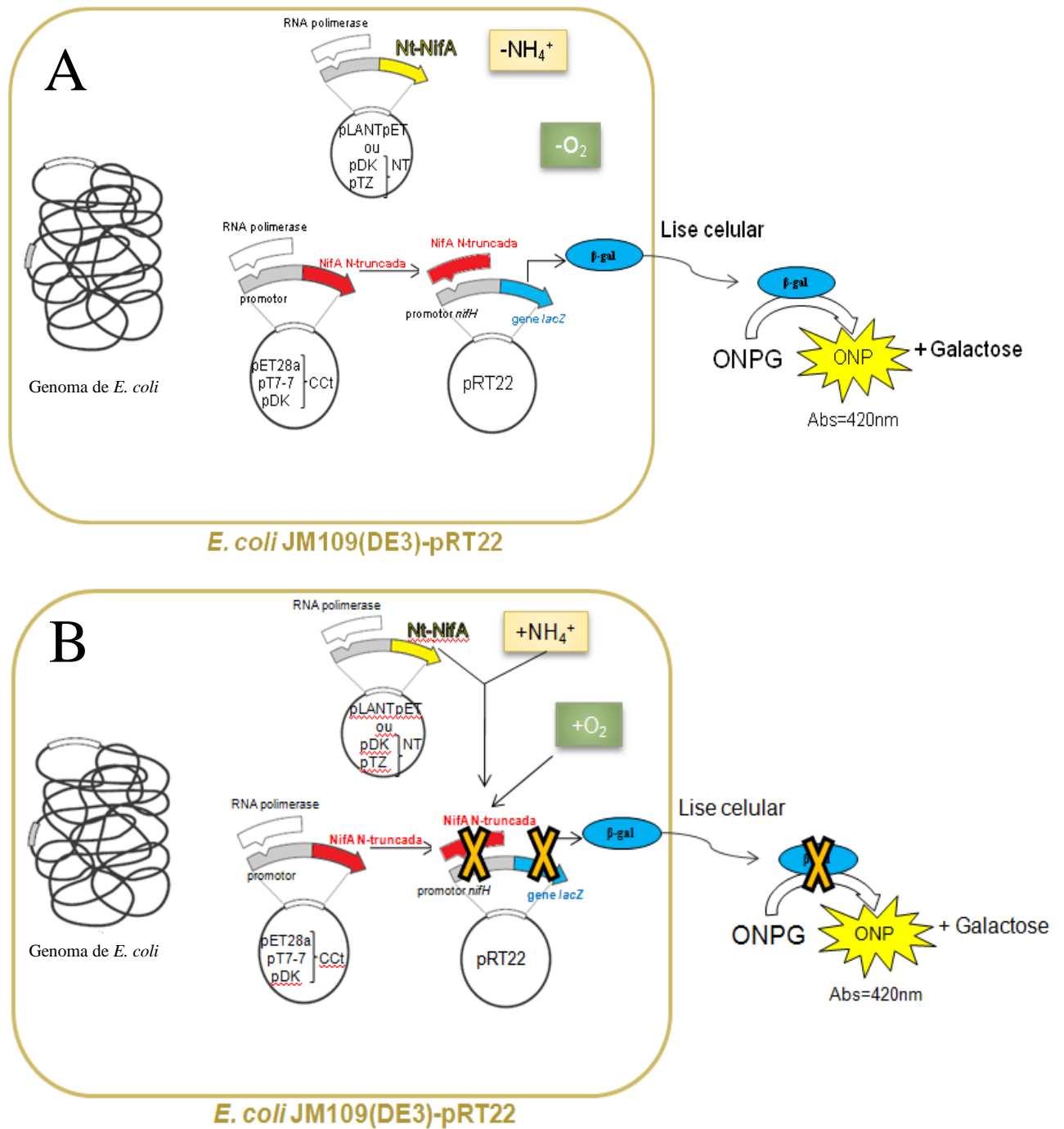


Figura 19 Esquema geral do ensaio de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada. **(A)** Na ausência de oxigênio e/ou de NH₄⁺ (e do domínio N-terminal) espera-se que a proteína NifA N-truncada esteja ativa e seja observada a atividade da enzima β -galactosidase. **(B)** Na presença de oxigênio e/ou de NH₄⁺ (e do domínio N-terminal) espera-se que a atividade da proteína NifA N-truncada esteja inibida, não haja transcrição da enzima β -galactosidase e não seja observada a atividade desta.

Os ensaios foram inicialmente realizados com células JM109(DE3) transformadas com os plasmídeos pRT22 e pCNT7CCT na presença ou na ausência de oxigênio. O plasmídeo pCNT7CCT expressa a proteína NifA N-truncada a partir do promotor T7 (Figura 20). Como controles negativos foram utilizadas células apenas com o plasmídeo pRT22 e células com os plasmídeos pRT22 e pLANTpET (que expressa o domínio N-terminal da proteína NifA). É possível observar ausência de atividade β -galactosidase em células transformadas somente com os plasmídeos pRT22 e/ou pLANTpET. Por outro lado, a atividade de β -galactosidase em células transformadas com os plasmídeos pRT22 e pCNT7CCT foi observada, indicando que a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense*, expressa nessas condições, é capaz de ativar a transcrição do promotor *nifH*. Entretanto, aparentemente não existe regulação por oxigênio, uma vez que a atividade de β -galactosidase foi observada em células mantidas na presença ou na ausência de O₂. Este resultado não era esperado, pois a proteína NifA de *A. brasilense* é sensível a O₂ (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). A ausência de controle por O₂ pode ser decorrente de um escape na expressão da proteína NifA N-truncada, que teria sido expressa nos pré-inóculos, e, dessa forma, parte da atividade observada seria advinda de uma proteína expressa antes da indução com IPTG.

Idealmente, a expressão da proteína NifA N-truncada deveria ocorrer somente após a indução com IPTG como resultado da síntese de RNA polimerase de T7, entretanto, uma expressão basal da RNA polimerase de T7 pode ocorrer a partir do promotor *lacUV5* presente em DE3, levando à síntese da proteína NifA N-truncada. Esse efeito é mais acentuado na ausência do gene *lacI*. Este gene codifica para o repressor *lac*, que, quando em lisogênicos DE3, atua tanto no cromossomo da célula hospedeira, reprimindo a transcrição do gene da T7 RNA polimerase pela polimerase do hospedeiro, quanto no promotor T7 do vetor, bloqueando a transcrição da proteína de interesse caso haja alguma T7 RNA polimerase que tenha sido transcrita. O gene *lacI*, presente em alguns plasmídeos (como por exemplo pET28a), permite, dessa forma, um controle mais rígido da expressão da proteína NifA N-truncada.

Para confirmar a hipótese de escape na expressão da proteína NifA N-truncada, analisamos a taxa de crescimento das células JM109 (DE3) transformada com os plasmídeos pRT22 e pCNT7CCT, na ausência de IPTG, concomitantemente com a atividade β -galactosidase. A Figura 21 mostra os resultados obtidos. No início do experimento, o número de células (indicado pela D.O.₆₀₀) é pequeno e a atividade de β -galactosidase é detectada (provavelmente decorrente do inóculo utilizado). Observa-se uma diminuição da atividade

específica de β -galactosidase até 4 horas de cultivo em decorrência do aumento no número de células. Entretanto, a partir da 5ª hora de cultivo pode ser observado aumento da atividade β -galactosidase provavelmente devido ao escape de expressão da NifA N-truncada e diminuição do teor de O_2 presente na cultura. Os resultados observados na Figura 21 também sugerem uma menor sensibilidade ao O_2 da proteína NifA de *A. brasilense* se comparada à de *H. seropedicae* (MONTEIRO et al., 1999).

Uma alternativa utilizada para diminuir o efeito do escape na expressão da proteína NifA N-truncada a partir do plasmídeo pCNT7CCT foi a transformação da célula que contém este plasmídeo com o vetor pET28a, que possui o gene *lacI*.

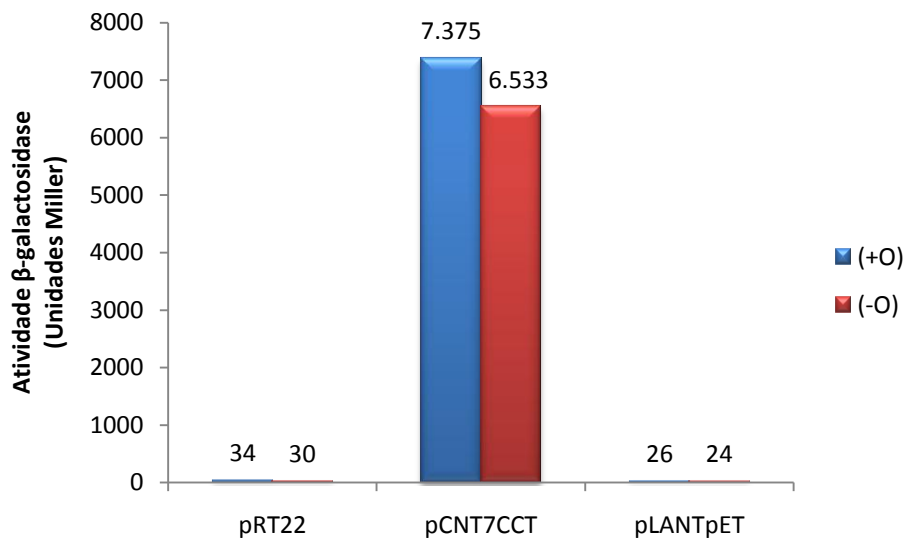


Figura 20 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* de uma fusão *nifH::lacZ* presente no plasmídeo pRT22 pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNT7CCT. O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos, na presença ou na ausência de oxigênio. A atividade de β -galactosidase foi determinada, os resultados apresentam um gráfico representativo do experimento e são apresentados em unidades Miller.

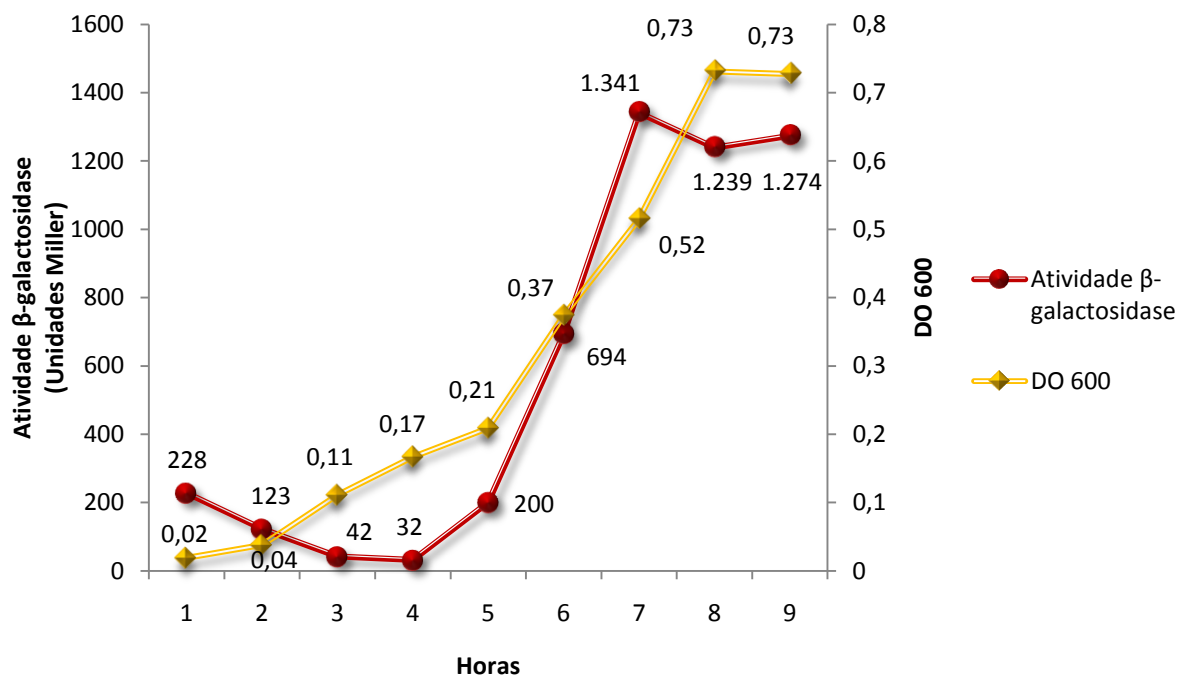


Figura 21 Curva de crescimento celular e de atividade β -galactosidase de células JM109 (DE3) transformadas com os plasmídeos pRT22 e pCNT7CCT na ausência de IPTG para verificar a presença de escape na expressão da proteína NifA N-truncada. As células foram inoculadas em meio LB e mantidas sob agitação a 37°C. Alíquotas foram retiradas nos intervalos indicados, sendo determinado a D.O.₆₀₀ (crescimento) e atividade de β -galactosidase presente, conforme descrito em Material e Métodos. A atividade de β -galactosidase é apresentada como unidades Miller.

A Figura 22 mostra o ensaio de ativação da transcrição utilizando células transformadas com o plasmídeo pCNT7CCT na presença do vetor pET28a. Pode-se observar que há um controle negativo na atividade da proteína NifA N-truncada na presença de oxigênio.

A fim de verificar o efeito *in trans* da co-expressão do domínio N-terminal de NifA sobre a proteína NifA N-truncada, o mesmo ensaio foi realizado em células contendo os plasmídeos pCNT7CCT e pLANTpET. Nossa expectativa era a regulação da atividade em resposta a adição de íons NH_4^+ ao meio de cultura, do domínio N-terminal sobre a proteína NifA N-truncada (Figura 22). Não foi observado controle por NH_4^+ na presença ou na ausência do domínio N-terminal. A diminuição de atividade quando o plasmídeo pLANTpET estava presente pode ser decorrente de uma menor expressão da proteína NifA N-truncada em vista da super-expressão de duas proteínas na mesma célula.

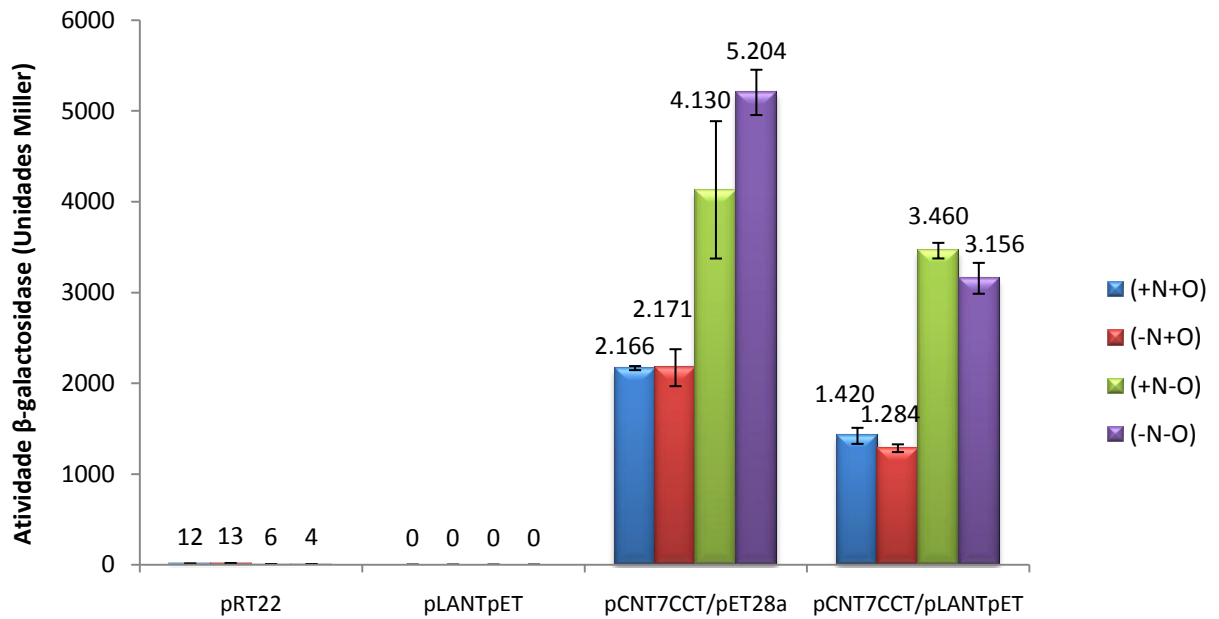


Figura 22 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNT7CCT na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir plasmídeo pLANTpET. O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença e na ausência de oxigênio (O) e/ou NH_4^+ (N). Os resultados apresentam um gráfico representativo do experimento, desvio padrão em torno da média de uma amostra em duplicata e são apresentados em Unidades Miller.

Ensaio semelhante foi realizado utilizando proteínas expressas a partir de promotor *tac*. A expressão a partir de promotor *tac* é menor se comparada ao promotor T7 diminuindo talvez o efeito de superexpressão das proteínas. O ensaio foi realizado com células transformadas com os plasmídeos pCNK6CCT e pCNK5NT (Apêndice A), como mostra a Figura 23. Resultado semelhante ao anterior foi observado: controle negativo por O_2 e ausência de controle por NH_4^+ .

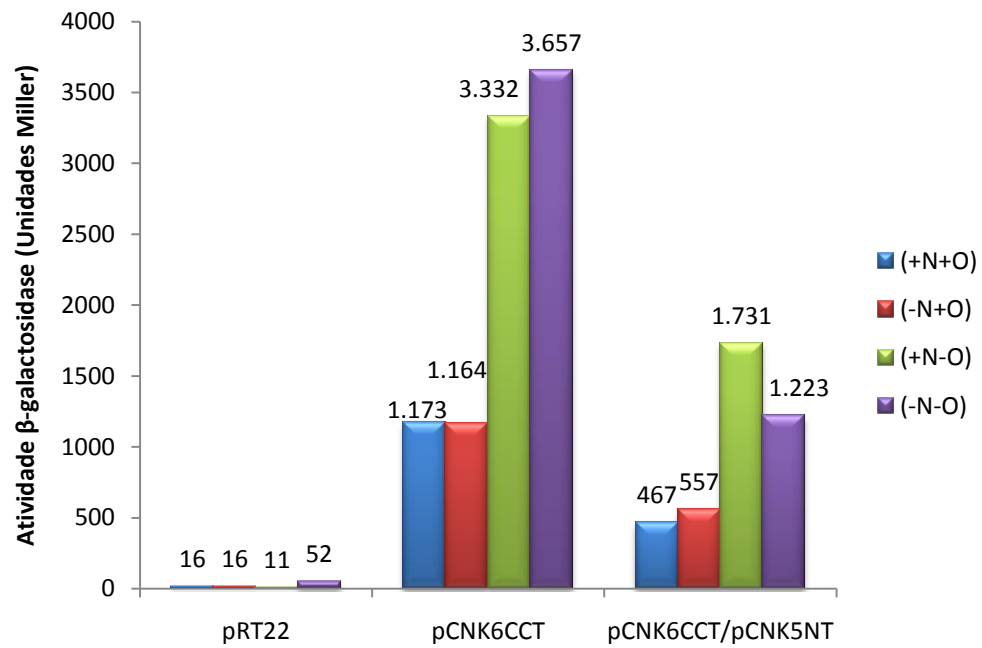


Figura 23 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNK6CCT na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir plasmídeo pCNK5NT. O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença e na ausência de oxigênio (O) e/ou NH_4^+ (N). Os resultados são representativos e apresentados em Unidades Miller.

A fim de confirmar que as proteínas de interesse estavam sendo expressas nas condições testadas, parte da cultura foi processada para separação de proteínas por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE). A Figura 24 mostra que ambas as proteínas são expressas a partir dos plasmídeos pCNT7CCT, pCNK6CCT, pLANTpET e pCNK5NT nas condições do ensaio e que, portanto, a ausência de regulação *in trans* por amônio da proteína NifA N-truncada não é devido a ausência de expressão do domínio N-terminal. É possível observar também uma diminuição do nível de expressão da proteína NifA N-truncada quando o domínio N-terminal é co-expresso, corroborando a diminuição de atividade de β -galactosidase observado.

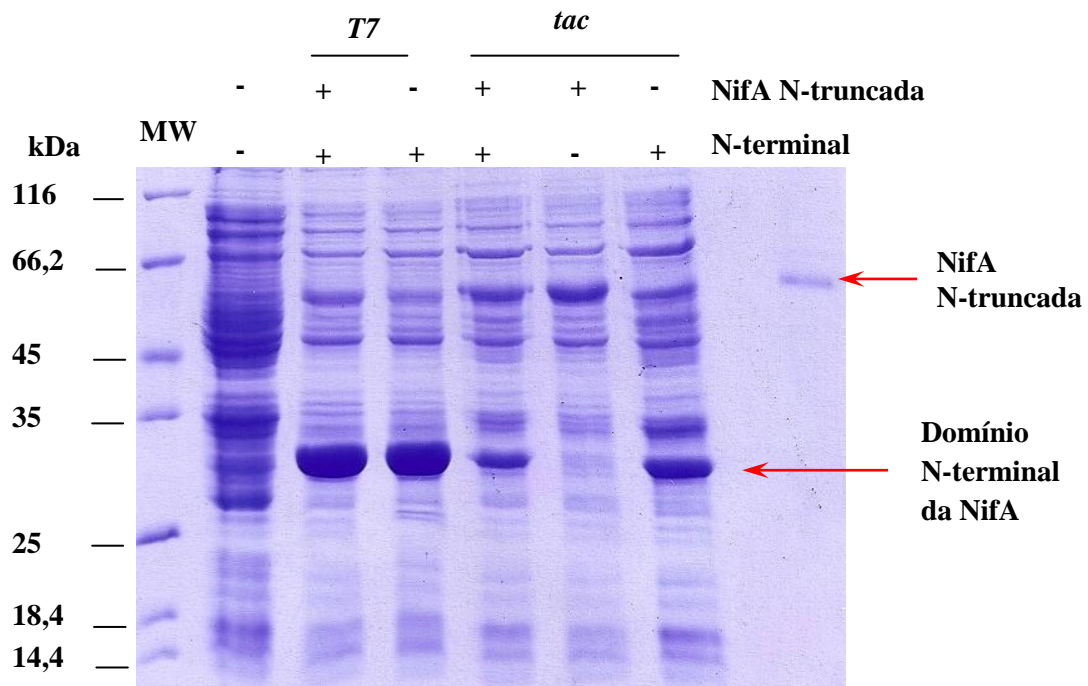


Figura 24 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de células JM109 (DE3) contendo o plasmídeo pRT22 e expressando as proteínas NifA N-truncada e/ou o domínio N-terminal. Os sinais – e + indicam ausência ou presença de plasmídeos expressando as proteínas indicadas. MW indica marcador de massa molecular (kDa) e as setas indicam a migração das proteínas de interesse. À direita é mostrada a proteína NifA N-truncada purificada. As proteínas foram expressas a partir de plasmídeos contendo os promotores T7 (pCNT7CCT e pLANTpET) ou *tac* (pCNK6CCT e pCNK5NT). As proteínas foram coradas com Coomassie-blue R250.

Outros ensaios também foram realizados utilizando combinações de plasmídeos a fim de obter diferentes níveis de expressão entre a NifA N-truncada e o domínio N-terminal e verificar a influência sobre o controle de ativação transcricional da proteína NifA N-truncada. Foram utilizados plasmídeos com promotores T7, *tac* e *lac*. Os resultados estão apresentados nas Figuras 25, 26 e 27. Como pode ser observado, os perfis dos gráficos de regulação da atividade transcricional da NifA N-truncada são semelhantes aos observados anteriormente, onde é observado um controle negativo da NifA N-truncada pelo oxigênio, mas não se observa regulação por íons NH_4^+ . Análise de proteínas presentes nos extratos celulares dessas culturas, indicam que as proteínas de interesse foram expressas (Figura 28 e dados não apresentados) e que, portanto, a falta de regulação por amônio não é decorrente da ausência de expressão das proteínas.

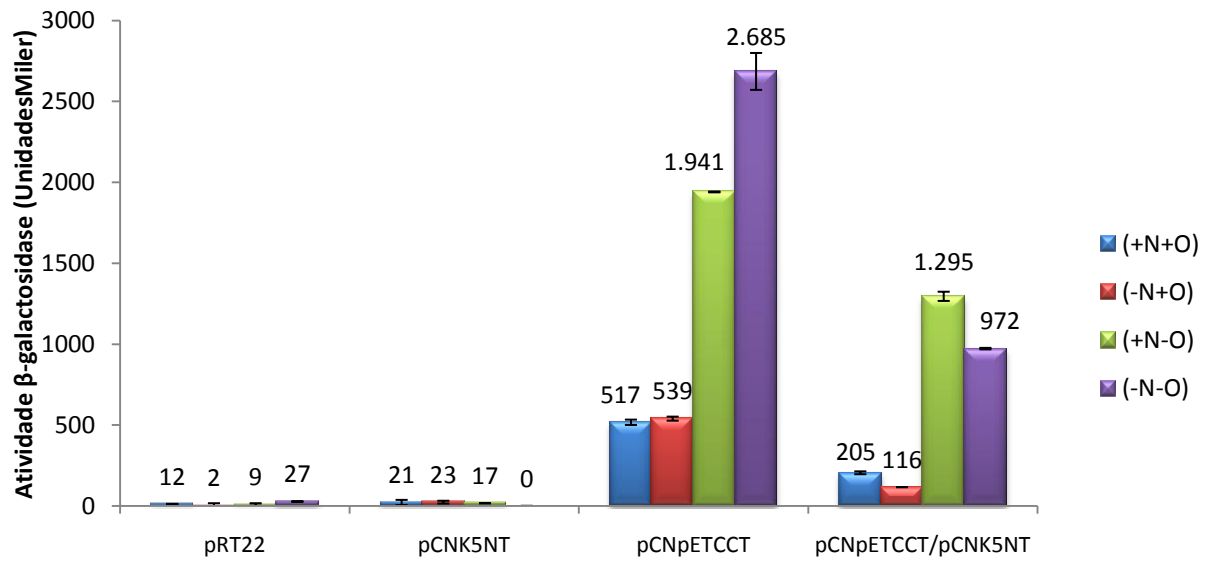


Figura 25 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNpETCCT (promotor T7) na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir do plasmídeo pCNK5NT (promotor *tac*). O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença e na ausência de oxigênio (O) e/ou NH_4^+ (N). Os resultados apresentam um gráfico representativo do experimento, desvio padrão em torno da média de uma amostra em duplicata e são apresentados em Unidades Miller.

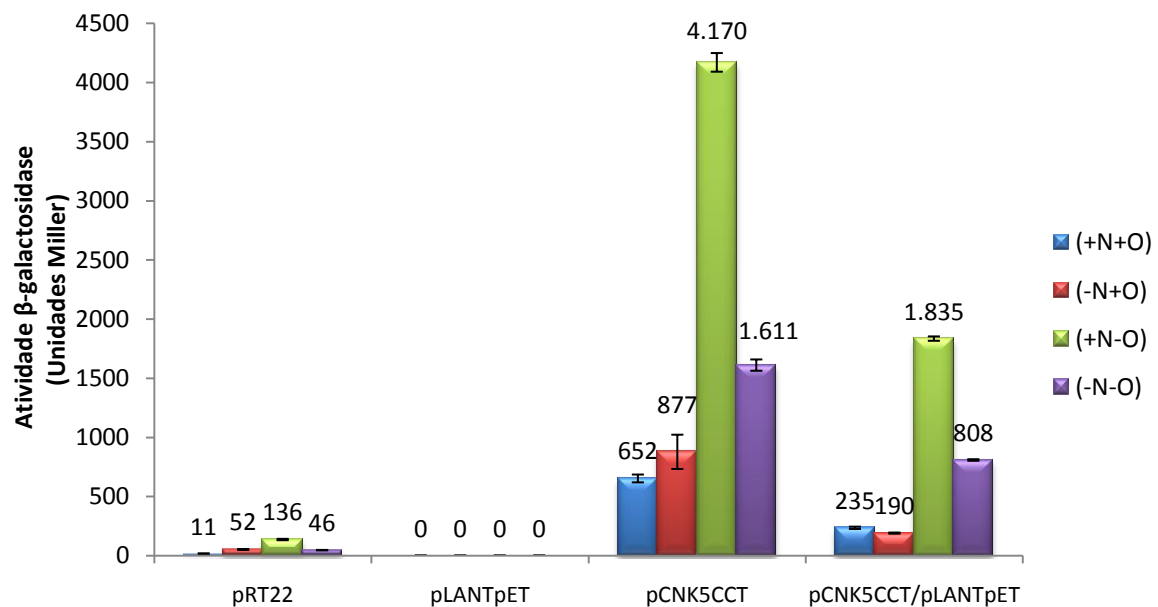


Figura 26 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNK5CCT (promotor *tac*) na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir do plasmídeo pLANTpET (promotor T7). O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença e na ausência de oxigênio (O) e/ou NH_4^+ (N). Os resultados apresentam um gráfico representativo do experimento, desvio padrão em torno da média de uma amostra em duplicata e são apresentados em Unidades Miller.

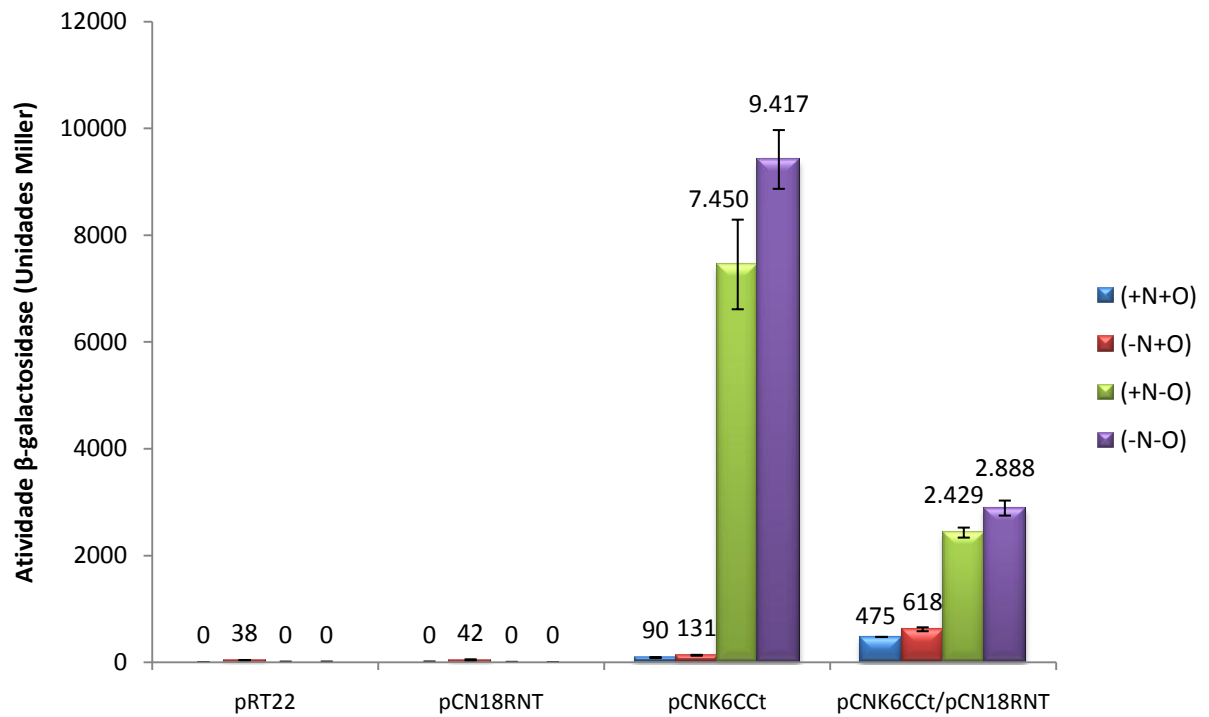


Figura 27 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do plasmídeo pCNK6CCT (promotor *tac*) na presença ou na ausência do domínio N-terminal expresso a partir do plasmídeo pCN18RNT (promotor *lac*). O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença e na ausência de oxigênio (O) e/ou NH_4^+ (N). Os resultados apresentam um gráfico representativo do experimento, desvio padrão em torno da média de uma amostra em duplicata e são apresentados em Unidades Miller.

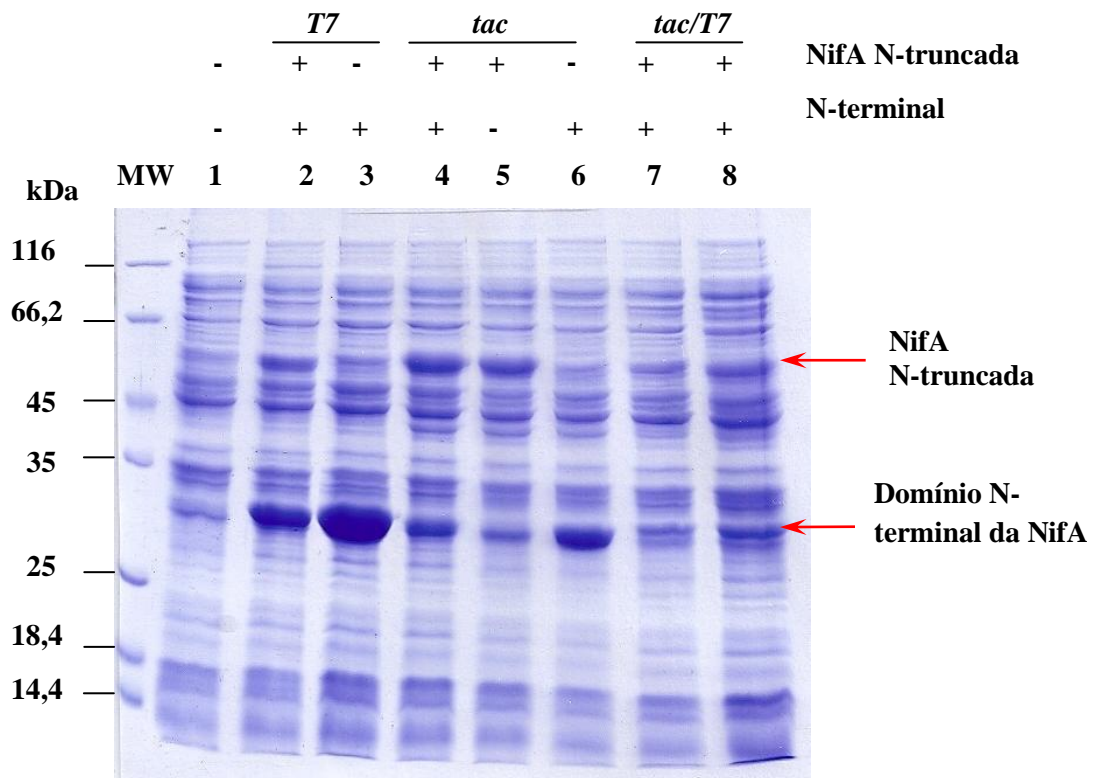


Figura 28 Eletroforese em gel desnaturante de poli-acrilamida 12% (SDS-PAGE) de células JM109 (DE3) contendo o plasmídeo pRT22 e expressando as proteínas NifA N-truncada e/ou o domínio N-terminal. Os sinais – e + indicam, respectivamente, ausência ou presença de plasmídeos expressando as proteínas indicadas. MW indica marcador de massa molecular (kDa) e as setas indicam a migração das proteínas de interesse. As proteínas foram expressas a partir de plasmídeos contendo os promotores T7 (pCNT7CCT e pLANTpET) ou *tac* (pCNK6CCT e pCNK5NT). Nas colunas 7 e 8 a proteína NifA N-truncada foi expressa a partir do plasmídeo pCNK5CCT e domínio N-terminal a partir do plasmídeo pLANTpET. As proteínas foram coradas com Coomassie-blue R250.

Os resultados do ensaio de ativação transcricional do gene de fusão *nifH::lacZ* pela proteína NifA N-truncada indicam que tanto a proteína nativa quanto a recombinante fusionada a cauda-His são capazes de ativar a transcrição na ausência de oxigênio e não apresentam controle por NH_4^+ . A proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* aparentemente também é menos sensível ao oxigênio que a de *H. seropedicae* (MONTEIRO et al., 1999). Na presença do domínio N-terminal e de íons NH_4^+ não observamos controle negativo da ativação transcricional. O perfil de ativação transcricional apresentado com as proteínas expressas a partir de diferentes promotores foi o mesmo (controle negativo da atividade da NifA N-truncada na presença de oxigênio, mas não observamos controle negativo na presença de NH_4^+ e do domínio N-terminal), indicando que provavelmente a ausência de controle

negativo da ativação transcricional não é devido aos diferentes níveis de expressão das proteínas, uma vez que foram confirmadas sua expressão por eletroforese em gel SDS-PAGE.

5 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que a proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense* purificada é capaz de ligar-se ao promotor *nifB* de *H. seropedicae* mesmo tendo sido purificada sob atmosfera de oxigênio. Oliveira et al. (2009) demonstraram que o motivo conservado de cisteínas da NifA de *H. seropedicae* é essencial para a ativação transcricional dos genes *nif*, porém a proteína mutada nestes resíduos mantém a capacidade de ligação ao DNA *in vitro* sob atmosfera de oxigênio, sugerindo que esta atividade não é alvo direto de controle pelo oxigênio da atividade da NifA. Porém, em presença de oxigênio a mudança no estado redox pode causar alteração conformacional no domínio central de tal forma que afete a especificidade de ligação ao DNA do domínio C-terminal. Dessa forma, a proteína purificada neste trabalho, embora tenha mostrado capacidade de ligação ao promotor *nifB* não apresentou especificidade.

As proteínas NifA N-truncada nativa ou fusionada a cauda His também foram testadas quanto à capacidade de ativação de transcrição do promotor *nifH* de *K. pneumoniae*, mostrando atividade *in vivo*. Os resultados de ativação transcricional indicam também que a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* parece ser menos sensível ao oxigênio se comparada a NifA N-truncada de *H. seropedicae*, a qual apresenta atividade β -galactosidase próxima a zero na presença de oxigênio (MONTEIRO, 1999). A proteína de *A. brasilense*, apesar de apresentar atividade de β -galactosidase menor na presença de oxigênio do que na ausência, a atividade na presença de oxigênio observada é significativamente alta quando comparada à dos controles negativos. Esta baixa sensibilidade ao oxigênio apresentada pela NifA N-truncada de *A. brasilense* pode ser alvo de estudos posteriores para melhor explicação deste efeito.

Neste trabalho os experimentos de regulação *in trans* do domínio N-terminal da proteína NifA sobre a forma NifA N-truncada não mostraram efeito sobre a atividade transcricional. Considerando que em estudos anteriores há evidências de que a atividade da NifA é controlada por NH_4^+ e pela PII através de mecanismos que envolvem o domínio N-terminal (ARSÈNE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996), a falta de influência do domínio N-terminal sobre a proteína N-truncada em nossos estudos pode ser decorrente de fatores como a conformação do domínio N-terminal, ausência ou falta de alguma outra molécula necessária neste controle, por exemplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L. M. Estudo *in vitro* das proteínas transdutoras de sinal GlnB e GlnZ de *Azospirillum brasilense*. 2008. 139f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80-105, 2001.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, O.; PÜHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206 base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 203, p. 715-738, 1988.

ARSÈNE F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA Activity by P_{II} in *Azospirillum brasilense*: Evidence for a Regulatory Role of the NifA N-Terminal Domain. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4830-4838, 1996.

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

ARAVIND, L.; PONTING, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 458– 459, 1997.

BALI, A., BLANCO, G., HILL, S., AND KENNEDY, C. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1711-1718, 1992.

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

BLANCO, G., DRUMMOND, M., WOODLEY, P., AND KENNEDY, C. Sequence and molecular analysis of the *nifL* gene of *Azotobacter vinelandii*. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 869-880, 1993.

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

BUCK, M.; CANNON, W.; WOODCOK, J. Mutational analysis of upstream sequences required for transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 9945-9956, 1987.

BUCK, M.; GALLEGOS, M. T.; STUDHOLME, D. J.; GUO, Y.; GRALLA, J. D. The Bacterial Enhancer-Dependent σ^{54} (σ^N) Transcription Factor. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 15, p. 4129-4136, 2000.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9339-9342, 1991.

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

CHAKRABARTI, R.; SCHUTT, C. E. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. **Gene**, v. 274, p. 293-298, 2001.

CHARBONNEAU, H.; PRUSTI, R. K.; LETRONG, H.; SONNENBURG, W. K.; MULLANEY, P. J.; WALSH, K. A.; BEAVO, J. A. Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 87, p. 288-292, 1990.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, J. L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr ->Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 273, p. 415-422, 2005.

COLLADO-VIDES, J.;MAGASANIK, B.; GRALLA, J. D. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. **Microbiology Reviews**, v. 55, p. 371-394, 1991.

de ZAMAROCZY, M. Structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Molecular Microbiology**, v. 29, n.2, p. 449-463, 1998.

de ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum*. **Molecular and General Genetics**, v. 224, n. 3p. 421-430, 1990.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional Organization of the *glnB-glnA* Cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2507-2515, 1993.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of Two Structurally Similar but Functionally Different PII Proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4143-4149, 1996.

DEKHIL, B. S.; CAHILL, M.; STACKEBRANT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *paroensis* to the new type species of *Conglomeromonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 72-77, 1997.

DIXON, R.; KHAN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nature Reviews**, v. 2, p. 621-631, ago 2004.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. (Eds.),

Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation, p. 518-538. Washington State University Press, Pullman, 1976.

DRUMMOND, M. H.; CONTRERAS, A.; MITCHENALL, L. A. The function of isolated domains and chimaeric proteins constructed from the transcriptional activators NifA and NtrC of *Klebsiella pneumonia*. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 29-37, 1990.

DRUMMOND, M. H.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. C. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumonia*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO Journal**, v. 5, p. 441-447, 1986.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 17-26, 2001.

FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 281-288, 1999.

FISCHER, H. M. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 352-386, 1994.

FISCHER, H. M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 5, p. 2207-2224, 1988.

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

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. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 1047-1059, 1989.

GONZÁLEZ, V.; OLVERA, L.; SOBERÓN, X.; MORETT, E. *In vivo* studies on the positive control function of NifA: a conserved hydrophobic amino acid patch at the central domain involved in transcriptional activation. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 55-67, 1998.

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

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 33-40, 2003.

HUERGO, L. F.; FILIPAKI, A.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Effect of over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 47-54, 2005.

ISHIDA, M. L. Construção e análise fisiológica de plasmídeos recombinantes capazes de expressar gene *nifA* de *Azospirillum brasilense*. 1996. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KANG, J.; LEE, M. S.; GORENSTEIN, D. G. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: Application to in vitro combinatorial selection of aptamers. **Journal of Biochemical and Biophysical methods**, v. 64, p. 147-151, 2005.

KHAMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, p. 45-55, 1989.

KITADE, Y.; OOTSUKA, S.; IITSUKA, O.; SAGA, N. Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) gene. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 555-557, 2003.

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

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 15 ago 1970

LEE, H. S.; BERGER, D. K.; KUSTU, S. Activity of purified NIFA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 2266-2270, 1993.

LIANG, Y. Y.; de ZAMAROCZY, M.; ARSENE, F.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C.. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, p. 113-120, 1992.

LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 2735-2744, 1991.

LITTLE, R.; DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 28711-28718, 2003.

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

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MCDOWELL, D. G.; BURNS, N. A.; PARKES, H. C. Localized sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in a competitive PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 26, p. 3340-3347, 1998.

MEAD, D. A.; SZCZENA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single strand DNA “blue”T7 promoter plasmids a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Prot. Eng.** v.1, p. 67-74, 1986.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zea* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007b.

MERRICK, M. J. In a class of its own — the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 903-909, 1993.

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

MERRICK, J. M. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. **Nitrogen Fixation: Hundred Years After**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, p. 293-302, 1988.

MERRICK, M. J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: G. STACY, R. BURRIS, AND H. EVANS (ed.), **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman Hall, p. 835-847, 1992.

MERRICK, M. J. Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Diazotrophs. In: KLIPP, W.; MASEPHOL, B.; GALLON, J. R.; NEWTON, W. E. (ed.). **Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 197-223, 2004.

MERRICK, M. J.; HILL, S.; HENNECKE, M.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular and General Genetics**, v. 185, p. 75-81, 1982.

MILCAMP, A.; KEYERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Identification of a *nifW*-like gene in *Azospirillum brasilense*. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1173, p. 237-238, 1993.

MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1992, p.325-355.

MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B.; CHUBATSU, L. S. Isolation of recombinant plasmids for rapid analysis using sodium dodecyl sulfate/ potassium chloride precipitation. **Analytical Biochemistry**, v. 292, n. 1, p. 169-170, 2001.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v. 447, p. 283-286, 1999.

MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 85, p. 9401-9405, 1988.

MORETT, E.; CANNON, W.; BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 24, p. 11469-11488, 1988.

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 19, p. 6067-6074, 1993.

OLIVEIRA, M. A. S.; BAURA, V. A.; AQUINO, B.; HUERGO, L. F.; KADOWAKI, M. A. S.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; PEDROSA, F. O.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A. Role of conserved cysteine residues in *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 389-395, 2009.

PASSAGLIA, L. M.; 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*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 7, p. 649-675, 1991.

PASSAGLIA, L. M. P.; SOOM, C. V.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S. Purification and binding analysis of the nitrogen fixation regulatory NifA protein from *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1363-1374, 1998.

PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, 900-915, 1983.

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

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56 (Pt 6), p. 1263-1271, 2006.

PERROUD, B.; BANDHARI, S.K.; ELMERICH, C. The *nifHDK* operon of *Azospirillum brasilense* Sp7. In: KLINGMÜLLER, W. (Ed.) ***Azospirillum III : Genetics, Physiology, Ecology***. Berlin: Springer, 1985, p. 10-19.

POPHAM, D. L.; SZETO, D.; KEENER, J.; KUSTU, S. Function of a Bacterial Activator Protein That Binds to Transcriptional Enhancers. **Science**, v. 243, p. 629-635, 1989.

POSTGATE, J. R. **The Fundamentals of Nitrogen Fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982, p. 375-385.

POTRICH, D. P.; BRESSEL, T. A.; SCHRANK, I. S.; PASSAGLIA, L. M. Sequencing and promoter analysis of the *nifENXorf3orf5fdxAnifQ* operon from *Azospirillum brasilense* Sp7. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1379-1395, 2001.

QUIVIGER, B.; FRANCHE, C.; LUTFALLA, G.; RICE, D.; HASELKORN, R.; ELMERICH, C. Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. **Biochimie**, v. 64, p. 495-502, 1982.

REGO, F. G. M. Análise estrutural e funcional do gene *rpoN* de *Herbaspirillum seropedicae*. 2006. 128f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; de LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43-51, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v.245, p. 215-222, 2002.

SHAPIRO, B. M. The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*: resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. **Biochemistry**, v. 8, p. 659–670, 1969.

SON, R. S; RHEE, S. G. Cascade Control of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p.8690-8695, 1987.

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

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487-506, 2000.

TABOR, S.; RICHARDSON, C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 82, p. 1074-1078, 1985.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.

TULI, R.; MERRICK, M.J. Over-production and characterization of the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae*-the transcription activator of *nif* gene expression. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 425-432, 1988.

UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H.; DAZZO, F. B. Association of *Azospirillum* with grass roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p. 219-226, 1980.

van HEESWIJK, W. C.; HOVING, S. MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KHAN, D. WESTERHOFF, H. V. An Alternative P_{II} protein in the regulation of Glutamine Synthetase in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 133-146, 1996.

VARADARAJ, K.; SKINNER, D. M. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. **Gene**, v. 140, p. 1-5, 1994.

VISWANATHAN, V. K.; KRUMHOLTZ, K.; CIANCIOFFO, N. P. Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification. **BioTechniques**, v. 27, p. 508-511, 1999.

WALKER, J. H.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M. J.; GAY, N. J. Distantly related sequences in the α and β subunits of ATP synthase, myosin, kinases and the ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO Journal**, v. 1, p. 945-951, 1982.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1435-1438, 2005.

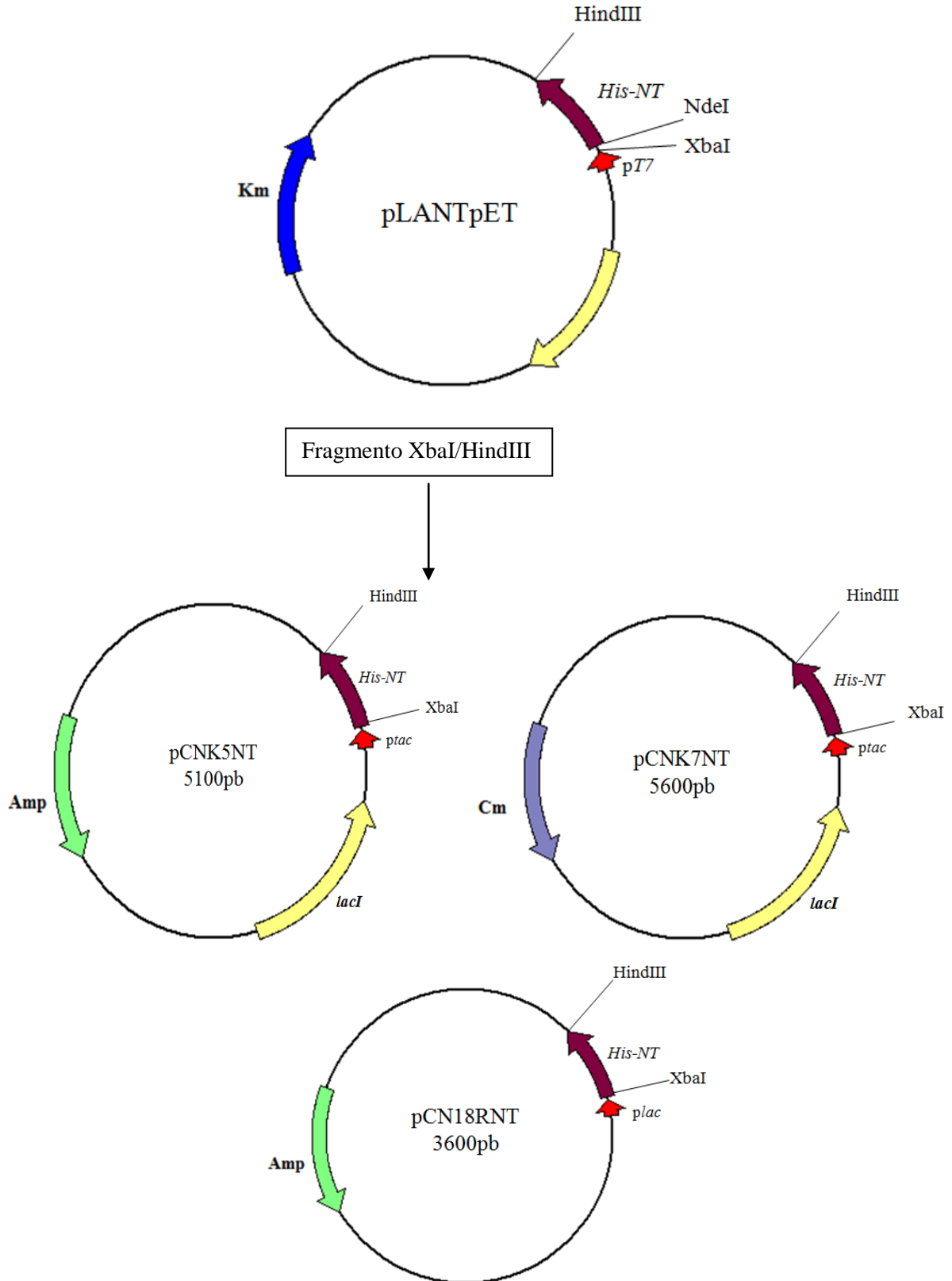
YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W.A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58 (Pt 4), p. 959-963, 2008.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of Nitrogen-fixing organisms. *In*: STACEY, G; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman e Hall, 1992, p. 685-735.

ZHOU, X. Y.; ZOU, X. X.; LI, J. L. Interaction between GlnB and the N-terminal domain of NifA in *Azospirillum brasilense*. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 22, p. 3546-3552, 2008.

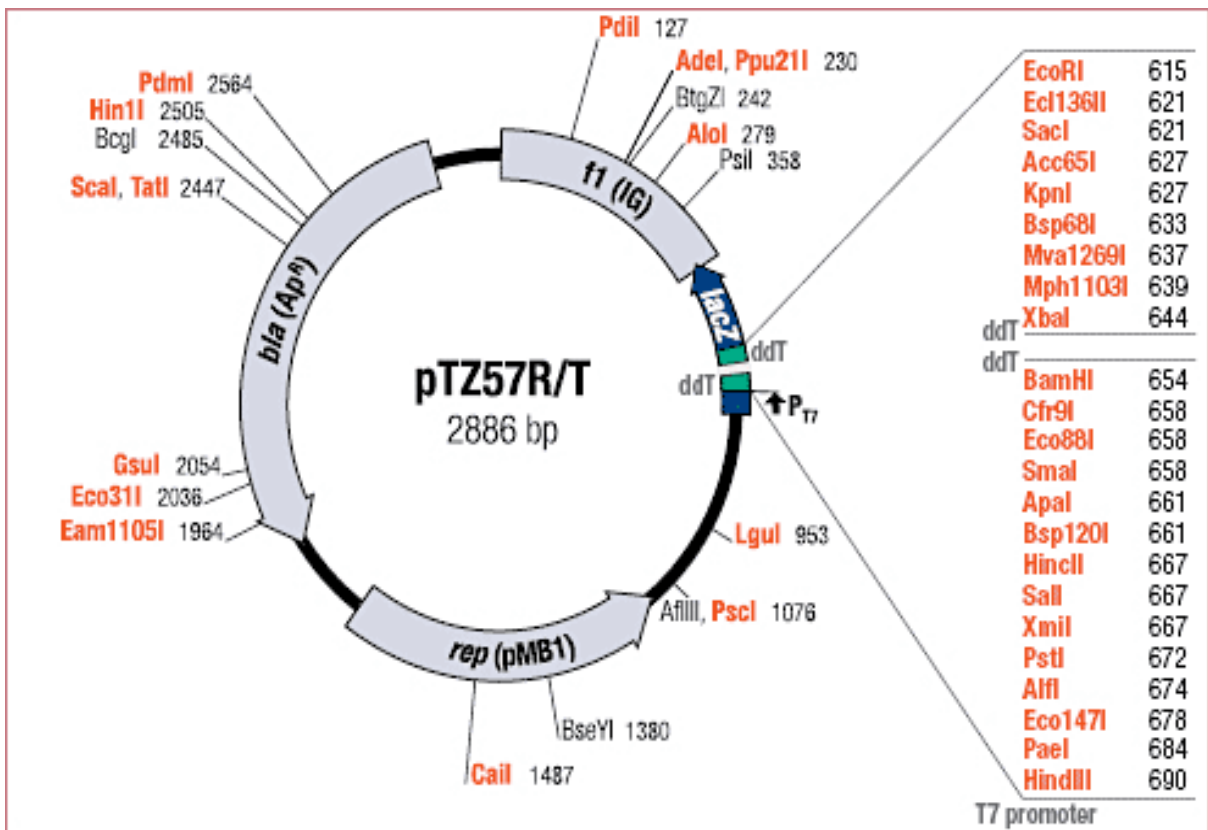
APÊNDICE

Apêndice A – Estratégia de clonagem do gene que codifica para o domínio N-terminal em vetores pDK5, pDK7 e pTZ18R. O fragmento do gene que codifica para o domínio N-terminal (His-NT) do plasmídeo pLANTpET (ARAÚJO, 2008) foi clonado XbaI/HindIII nesses vetores, gerando os plasmídeos pCNK5NT, pCNK7NT e pCN18RNT, respectivamente.

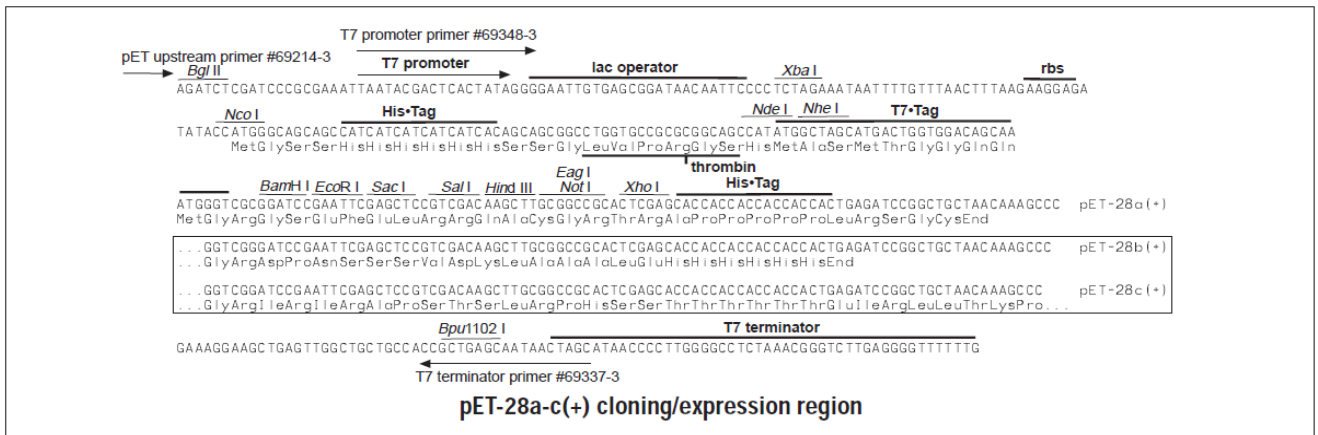
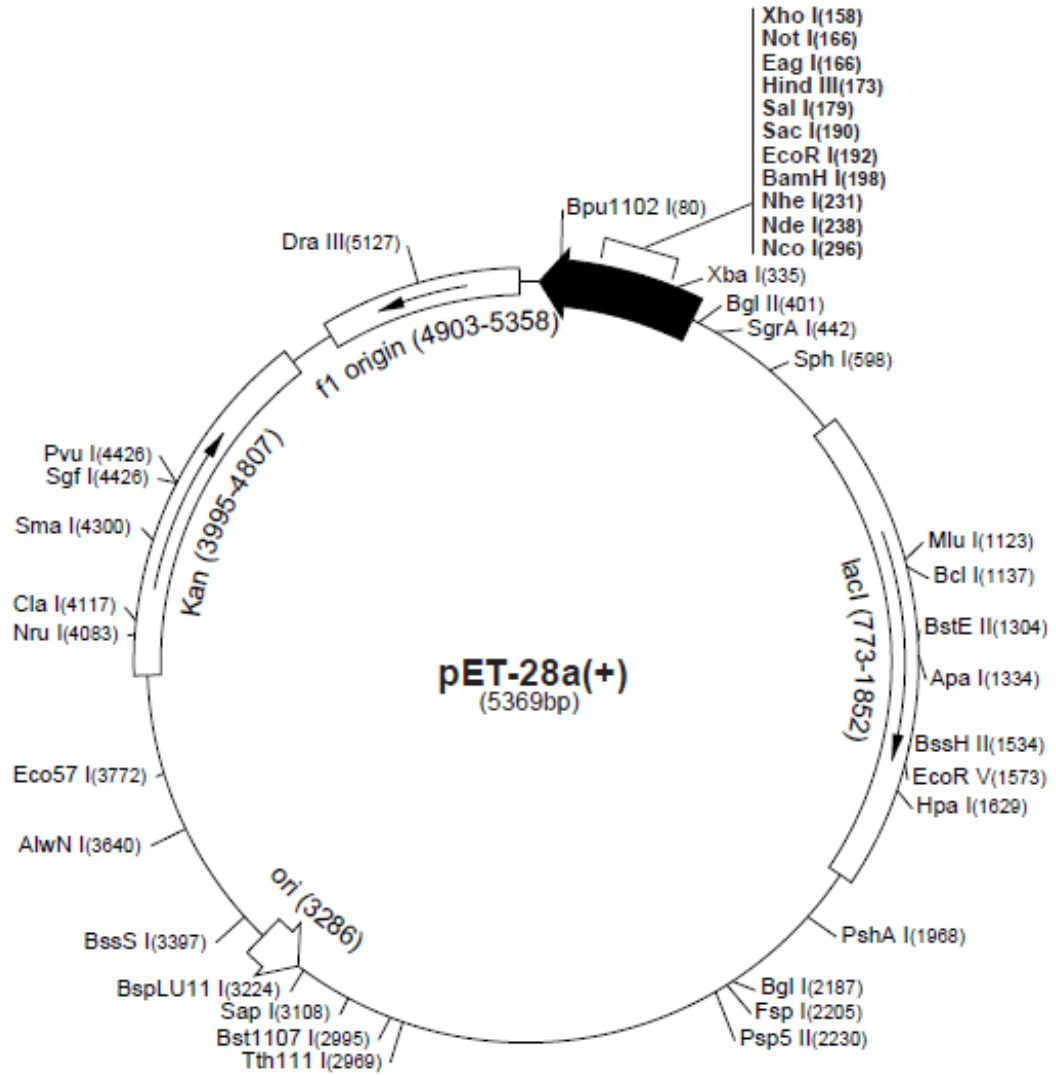


ANEXOS

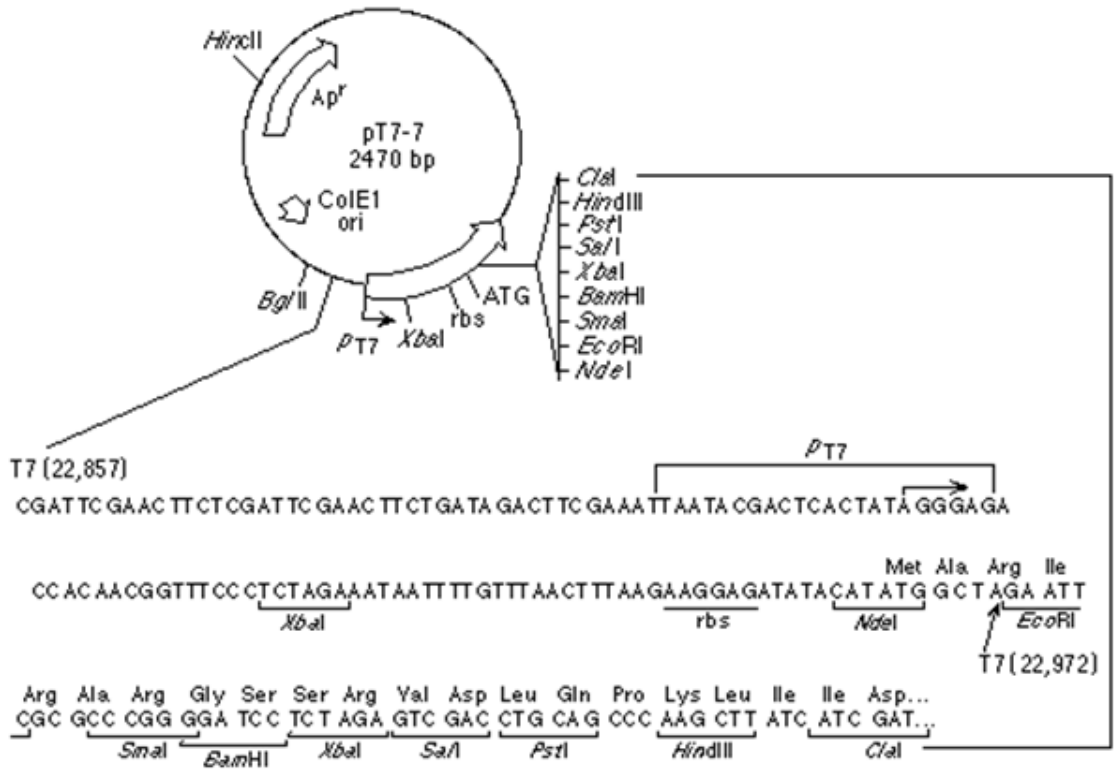
Anexo A – Vetor de clonagem pTZ57R/T (Fermentas)



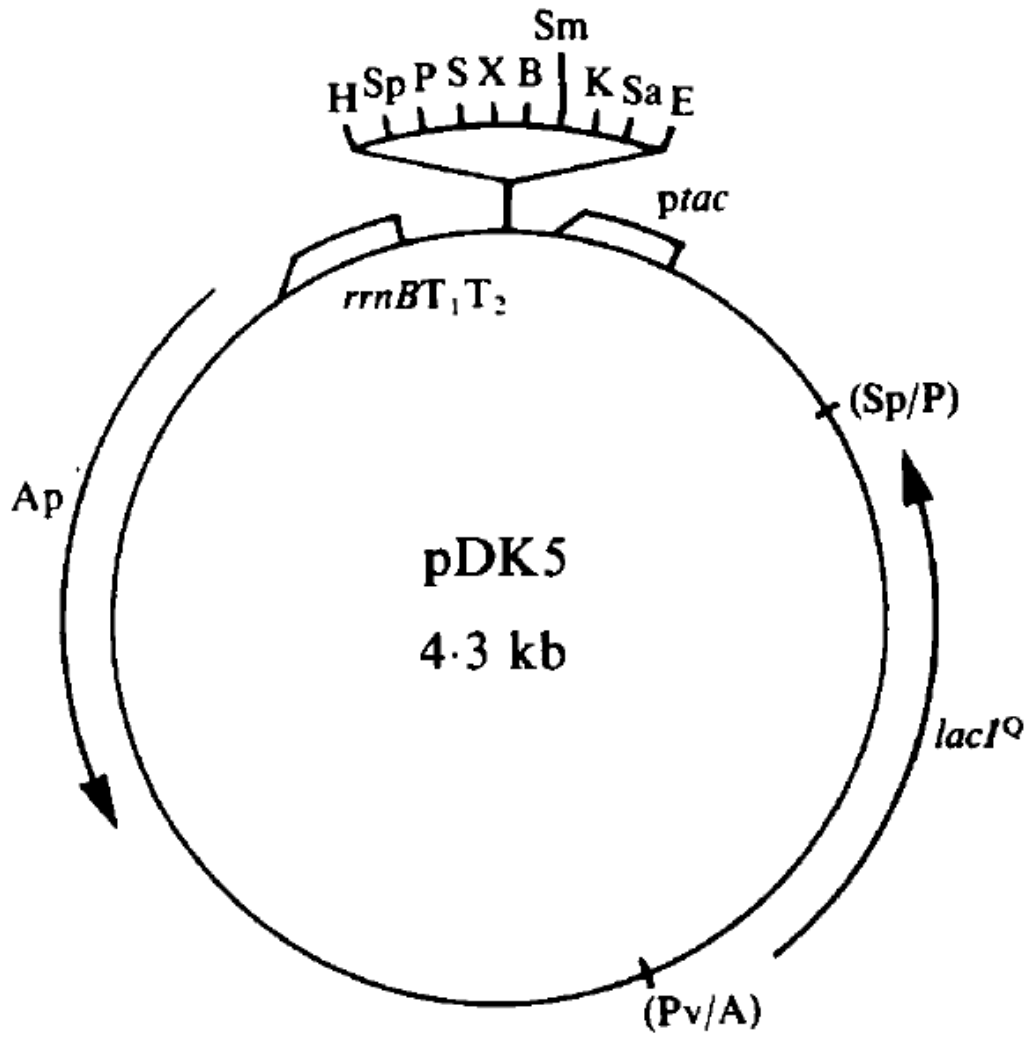
Anexo B – Vetor de expressão pET28a (Novagen)



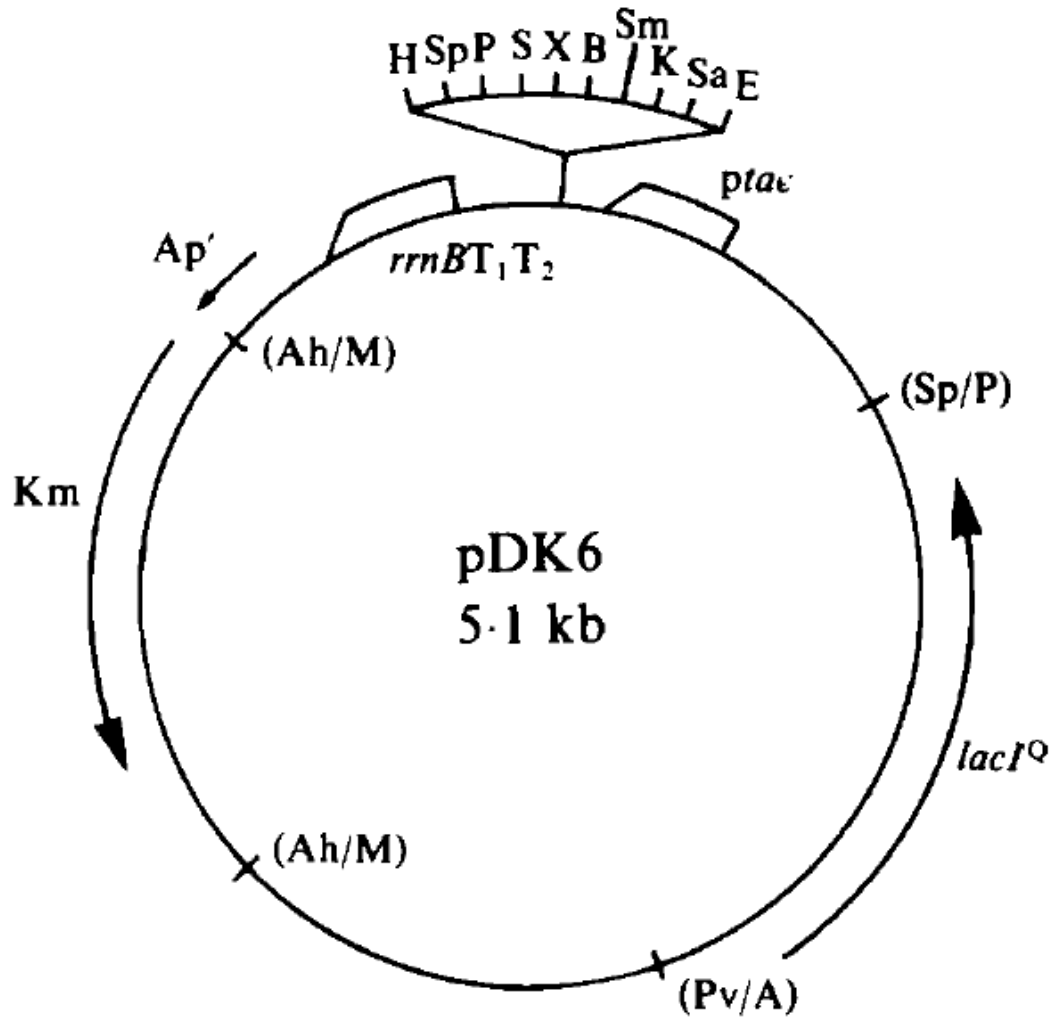
Anexo C – Vetor de expressão pT7-7 (Tabor e Richardson, 1985)



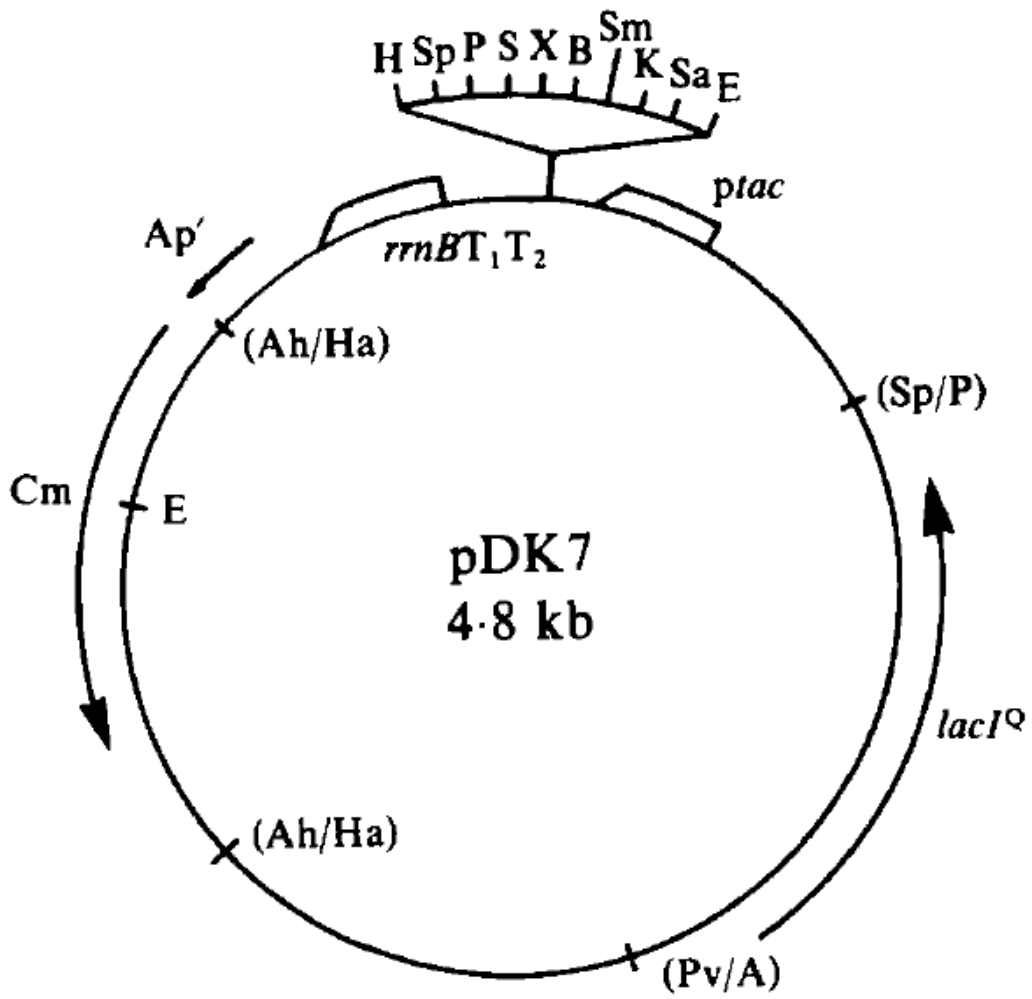
Anexo D – Vetor de expressão pDK5 (Kleiner et al., 1988)



Anexo E – Vetor de expressão pDK6 (Kleiner et al., 1988)



Anexo F – Vetor de expressão pDK7 (Kleiner et al., 1988)



Anexo G – Vetor de expressão pTZ18R (Mead; Szczena-skorupa e Kemper, 1986)

