

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO AQUINO

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS NIFA MUTANTES PONTUAIS DE
Herbaspirillum seropedicae.

CURITIBA

2012

BRUNO AQUINO

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS NIFA MUTANTES PONTUAIS DE
Herbaspirillum seropedicae.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadoras: Prof^a. Dr^a Leda S. Chubatsu

Prof^a. Dr^a Rose A. Monteiro

Curitiba

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNO AQUINO

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS NIFA MUTANTES PONTUAIS DE
Herbaspirillum seropedicae.**

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



Prof.ª Drª. Leda Satie Chubatsu - orientador
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.ª Drª. Ana Claudia Bonatto
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2012

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiro de tudo agradecer às minhas orientadoras Leda S. Chubatsu e Rose A. Monteiro, sou muito grato por tudo. Também agradeço aos outros professores do grupo de fixação de nitrogênio.

Um agradecimento especial ao Marco A. S. de Oliveira que realmente me ajudou muito na execução deste projeto desde o início.

Agradeço muito aos técnicos do laboratório (Valter, Dona Rose e Alex) pelo suporte nos experimentos.

Gostaria de agradecer aos amigos do laboratório que ajudaram na execução deste trabalho, sendo com discussões ou distrações.

Aos colegas da turma de mestrado.

Às agências financiadoras (CNPq; INCT-FBN).

A pós-graduação em Ciências-Bioquímica.

À Deus e minha família.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1.INTRODUÇÃO	13
1.1.Fixação Biológica de Nitrogênio	13
1.2.Gênero <i>Herbaspirillum</i>	14
1.3.Proteínas do tipo PII	14
1.4.Transcrição do gene <i>nifA</i>	16
1.5.Proteína NifA	16
1.6.Regulação da Atividade de NifA.....	19
1.6.1.Regulação da atividade da NifA em organismos que possuem NifL.....	20
1.6.2.Regulação da atividade da NifA em organismos que não possuem NifL.....	22
2.JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	26
2.1.Justificativa	26
2.2.Objetivos	26
2.2.1.Objetivo geral.....	26
2.2.2.Objetivos específicos.....	26
3.MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1.Bactérias e Plasmídeos.....	27
3.2.Meios de cultura	30
3.3.Transformação Bacteriana	30
3.3.1.Células Termocompetentes.....	30
3.3.2.Células Eletrocompetentes.....	30
3.4.Purificação do DNA plasmidial	31
3.5.Eletroforese de DNA e Proteína	32
3.6.Conjugação Bacteriana	32
3.7.Construção dos mutantes no gene <i>nifA</i>	33
3.7.1.Construção do plasmídeo pBA3 e pBA4.....	33
3.8.Construção da fusão <i>nifH::lacZ</i>	33

3.8.1.Construção do plasmídeo contendo a fusão <i>nifH:lacZ</i>	33
3.8.2.Obtenção das estirpes de <i>H. seropedicae</i> com a fusão <i>nifH:lacZ</i> cromosomal.....	34
3.9.Mutagênese sítio-dirigida da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i>	34
3.10.Ensaio de ativação de transcrição das fusões <i>nifH:lacZ</i>	38
3.10.1.Ensaio de β -galactosidase das proteínas NifA em <i>E. coli</i>	38
3.10.2.Determinação da atividade de β -galactosidase das proteínas NifA N-truncadas em <i>E. coli</i>	39
3.10.3.Determinação da atividade de β -galactosidase em <i>H. seropedicae</i>	39
3.11.Determinação da atividade da nitrogenase	39
4.RESULTADOS	41
4.1.Obtenção dos mutantes no gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i>	41
4.2.Atividade de Nitrogenase dos mutantes no gene <i>nifA</i>	42
4.3.Análise da capacidade de ativação da transcrição das proteínas NifA mutantes em <i>E. coli</i>	43
4.4.Atividade de Nitrogenase dos mutantes no gene <i>nifA</i> complementados com NifA mutagenizada.....	47
4.5.Análise da atividade da proteína NifA-G25E em <i>H. seropedicae</i>	48
5.DISSCUSSÃO	51
6.CONCLUSÕES	57
7.REFERÊNCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i>	18
Figura 2: Desenho esquemático das proteínas NifA de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i> e da proteína quimérica NifAQ1.	23
Figura 3: Esquema da construção dos plasmídeos pBA3 e pBA4.	33
Figura 4: Esquema da construção da fusão <i>nifH</i> (<i>H. seropedicae</i>): <i>lacZ</i> no vetor pTZ18R.	34
Figura 5: Alinhamento dos aminoácidos de partes da proteína NifA de vários diazotrofos.	35
Figura 6: Estratégia para inserção de mutações sítio dirigidas no gene <i>nifA</i>	37
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do gene <i>nifA</i> nas estirpes selvagem e mutantes de <i>H. seropedicae</i>	42
Figura 8: Atividade de nitrogenase das estirpes selvagem e mutantes de <i>H. seropedicae</i>	43
Figura 9: Expressão das proteínas NifA mutantes em <i>E. coli</i> estirpe JM109(DE3).	44
Figura 10: Atividade de β -galactosidase da proteína NifA inteira em <i>E. coli</i>	45
Figura 11: Atividade de β -galactosidase das proteínas NifAs N-truncadas.	46
Figura 12: Expressão das proteínas NifA N-truncadas em <i>E. coli</i> estirpe JM109(DE3).	47
Figura 13: Atividade de β -galactosidase em <i>H. seropedicae</i> com fusão cromosomal <i>nifH:lacZ</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bactérias e Plasmídeos.	27
Tabela 2: “Primers” mutagênicos utilizados na construção dos genes <i>nifA</i> mutados.....	36
Tabela 3: Mutação, origem e fenótipo das mutações realizadas na proteína NifA.	37
Tabela 4: Complementação da atividade de nitrogenase nas estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	– 2-oxoglutarato
AAA+	– ATPases associadas com várias atividades celulares
ADP	– Adenosina difosfato
Amp ^R	– Resistência a ampicilina
ATP	– Adenosina trifosfato
cGMP	– Guanosina monofosfato cíclica
Cm ^R	– Resistência a cloranfenicol
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	– Densidade ótica a 600 nanômetros
EBP	– do inglês “ <i>enhancer binding protein</i> ”
EDTA	– Ácido etilenodiamino-tetra-acético
FAD	– Flavina adenina dinucleotídeo
HTH	– do inglês, “ <i>Helix-turn-Helix</i> ”
IHF	– Fator de interação do hospedeiro
IPTG	– β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
Kb	– Quilo base
KDa	– Quilo Daltons
Km ^R	– Resistência a canamicina
LID	– Região Interdomínio da NifA
LQ	– Região Interdomínio da NifA rico em glutamina
MW	– Massa molecular
ONPG	– o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
pb	– Pares de base
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
ppm	– Partes por milhão
RNA	– Ácido ribonucleico
RPM	– Rotações por minuto
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
Sm ^R	– Resistência a estreptomicina
Tc ^R	– Resistência a tetraciclina

- TRIS – Tris(hidroximetil)-aminometano
- UAS – Sequência ativadora localizada a montante
- UMP – Uridina monofosfato
- UV – Radiação ultra-violeta
- X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosídeo

RESUMO

A proteína NifA é o principal regulador transcricional da fixação biológica de nitrogênio. Essa proteína é responsável pela ativação dos genes *nif* e sua atividade é regulada pelos níveis de nitrogênio e oxigênio. NifA possui três domínios estruturais: um domínio N-terminal regulatório que possui um motivo GAF; um domínio central que possui a função de hidrolisar o ATP e catalizar a formação do complexo aberto; e um domínio C-terminal que é responsável pela ligação ao DNA. Em *Herbaspirillum seropedicae*, uma β -proteobacteria capaz de colonizar gramíneas de interesse comercial, o domínio N-terminal GAF responde aos níveis de nitrogênio fixado de forma dependente da proteína transdutora de sinais GlnK. Quando o domínio regulatório GAF é removido, a proteína continua ativa, porém perde a regulação por nitrogênio. A proteína NifA também é ativa somente em condições de baixa concentração de oxigênio e esta sensibilidade está relacionada a um provável cluster de FeS presente no domínio central e região interdomínio com o domínio C-terminal. Neste trabalho, utilizamos mutações sítio-dirigidas para analisar o mecanismo de regulação da NifA em resposta aos níveis de nitrogênio e também por oxigênio. As mutações K22V, T160E, M161V, L172R, A215D e S220I resultaram em proteínas NifA incapazes de ativar a síntese da nitrogenase. Por outro lado, a mutação Q216I, localizada do domínio central, resultou em uma proteína NifA ativa, com fenótipo semelhante à selvagem, sugerindo que a mutação introduzida não altera a regulação da proteína de forma significativa. Já a mutação G25E, localizada no domínio N-terminal, gerou uma proteína ativa regulada por nitrogênio, no entanto independente de GlnK. Esse resultado indica que o resíduo de glicina na posição 25 é importante tanto na interação com GlnK quanto na interação do domínio N-terminal com o domínio Central.

ABSTRACT

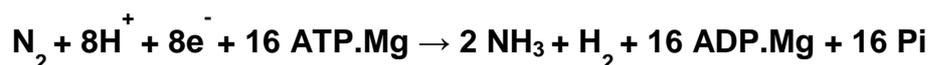
The NifA protein is the central regulator of biological nitrogen fixation. This protein is responsible for activating the transcription of *nif* genes and it is regulated by both nitrogen and oxygen levels. NifA protein comprises three structural domains: a regulatory amino-terminal GAF domain; a catalytic Central domain, that hydrolyze ATP and catalyzes open complex formation; and a carboxy-terminal domain involved in DNA-binding. In *Herbaspirillum seropedicae*, a β -proteobacterium capable of colonizing important crops, the regulation by fixed nitrogen involves the GAF domain and the signal transduction protein GlnK. When the GAF domain was removed the protein remained active but without nitrogen regulation. Also, this protein is active only under low oxygen concentrations, and this sensitivity may be related to a FeS cluster located in the Central domain and the interdomain region with C-terminal domain. Here we analysed the nitrogen and oxygen regulation of *H. seropedicae* NifA using single point-mutation. Mutations K22V, T160E, M161V, L172R, A215D and S220I resulted in proteins that were unable to activate the nitrogenase synthesis. On the other hand, the point mutation Q216I, located in the Central domain, lead to an active protein, with a phenotype similar to the native NifA, suggesting that this mutation did not modify its regulation significantly. Furthermore the mutation G25E, located in the GAF domain, resulted in an active protein regulated by nitrogen, but independent of GlnK. This result indicates that the glycine residue at the position 25 might be important for interaction with GlnK and also in the interaction between the N-terminal and Central domain.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para a síntese de biomoléculas importantes como os aminoácidos e nucleotídeos, que compõem as proteínas e DNA respectivamente. Apesar de abundante na natureza na forma de gás dinitrogênio, a maioria dos organismos não é capaz de utilizar essa molécula como fonte deste elemento. Alguns procaríotos, chamados diazotrofos, são capazes de converter o N₂ em amônia em um processo chamado fixação biológica de nitrogênio.

Esse processo é dependente de ATP e é realizado pelo complexo da nitrogenase, em condições microaeróbicas, de acordo com a estequiometria abaixo (SIMPSON; BURRIS, 1984; RAYMOND et. al., 2004).



O complexo da nitrogenase é composto por duas proteínas: dinitrogenase e dinitrogenase redutase (BULEN; LECOMTE, 1966; HAGEMAN; BURRIS, 1980). A primeira é um heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$, onde a subunidade α é codificada pelo gene *nifD* e a subunidade β é codificada pelo gene *nifK*. Na subunidade α está localizado o sítio ativo para a redução do dinitrogênio, normalmente um cluster de metal contendo molibdênio, denominado FeMoco. Alguns organismos, na falta de molibdênio, expressam nitrogenases alternativas, contendo vanádio ou ferro (EADY, 1996). Recentemente pesquisadores identificaram o carbono como átomo central deste cluster (MoFe₇S₉C). Essa descoberta poderá ajudar na compreensão do mecanismo de quebra da tripla ligação da molécula de N₂ (LANCASTER et al., 2011; SPATZAL et al., 2011). A segunda proteína do complexo é um homodímero, onde as duas subunidades γ , codificadas pelo gene *nifH*, são ligadas por um centro 4Fe-4S (KIM; WOO; REES, 1993).

O mecanismo de redução do dinitrogênio inicia-se com a transferência de elétrons da dinitrogenase redutase, também conhecida como proteína Fe, para a dinitrogenase, também conhecida como proteína FeMo, esse processo requer a hidrólise de 2 moléculas de ATP a cada elétron transferido. Depois de transferido os elétrons, o N₂ se liga no sítio ativo da enzima e é convertido em NH₃ (HOWARD;

REES, 2006). Após a redução, o nitrogênio é incorporado em moléculas chave do metabolismo de nitrogênio, como glutamato e glutamina.

1.2 Gênero *Herbaspirillum*

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são gram negativas, vibrióide, com um a três flagelos, pertencem a classe betaproteobacterias e são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (BALDANI et al., 1986). O organismo deste estudo, *Herbaspirillum seropedicae*, é uma bactéria endofítica e foi isolado por Baldani e colaboradores (1986). Esta bactéria é encontrada em associação com raízes de gramíneas de interesse econômico como milho, arroz, sorgo e cana-de-açúcar. Posteriormente, Cruz e colaboradores (2001) encontraram este organismo em bananeiro e abacaxizeiro. Koopman e colaboradores (2010) encontraram representantes deste gênero em *Sarracenia alata*, uma planta carnívora. A interação desta bactéria com plantas ainda não é muito bem compreendida, no entanto a inoculação de *H. seropedicae* em arroz levou um aumento no peso úmido e seco das plantas (GYANESHWAR et al., 2002). Ainda, James e colaboradores (2002) verificaram que *H. seropedicae* estirpe Z67 era capaz de colonizar a superfície das raízes e tecidos internos de arroz, resultando no aumento da biomassa radicular. O mesmo foi observado por Roncato-Maccari e colaboradores (2003).

Alguns organismos deste gênero foram encontrados em infecções de pulmão em pacientes com fibrose cística. Como não há indícios de que essas bactérias sejam patogênicas, acredita-se que essas infecções foram ocasionadas por bactérias oportunistas (SPILKER et al., 2008).

1.3 Proteínas do tipo PII

As proteínas do tipo PII pertencem a uma família de proteínas responsável pela transdução de sinal de nitrogênio, carbono e energia no metabolismo celular e estão presentes em Bacteria, Archaea e Eucarya (ARCONDEGUY; JACK; MERRICK, 2001). Em Bacteria, essas proteínas são homotriméricas, capazes de ligar ATP e 2-oxoglutarato (2-OG), e sua atividade é regulada de acordo com seu estado de uridililação (KAMBEROV; ATKINSON; NINFA, 1995; TRUAN et al., 2010). Muitos organismos apresentam mais de uma proteína PII que podem apresentar diferentes funções. Apesar disso, a estrutura tridimensional dessas proteínas é muito

semelhante, sendo que a GlnB de *Escherichia coli* é composta de 2 α -hélices e 6 folhas- β pregueada. As duas α -hélices e as folhas- β pregueada 1 e 4 formam 2 motivos $\beta\alpha\beta$ que estão conectados pela volta T. A volta B liga a segunda α -hélice à quarta folha- β , e na região C-terminal, a volta C une as folhas- β 5 e 6 (CHEAH et al., 1994; CARR et al., 1996). Quando a proteína está na sua forma trimérica, há a formação de três cavidades. Na cavidade formada pela volta C de um monômero e pela volta T do monômero adjacente é onde o ATP se liga (XU et al., 2001).

A uridililação das proteínas da família PII, que ocorre no resíduo conservado Tyr51, é realizada pela proteína GlnD em resposta a condição limitante de nitrogênio. A desuridililação é catalisada pela mesma enzima em resposta ao excesso de nitrogênio fixado (ATKINSON; NINFA, 1998; JIANG; ZUCKER; NINFA, 1997).

Em *E. coli* foram identificadas duas proteínas PII, GlnB e GlnK. A proteína GlnB é expressa constitutivamente e GlnK apenas na ausência de nitrogênio fixado (ATKINSON; BLAUWKAMP; NINFA, 2002). Estas proteínas atuam como transdutoras de sinal para proteínas reguladoras como NtrB/NtrC, reguladoras do metabolismo de nitrogênio e NifA, reguladora da fixação biológica de nitrogênio. No metabolismo do nitrogênio, quando GlnB está na sua forma uridililada, ou seja, quando não há nitrogênio fixado disponível, não consegue interagir com a proteína regulatória NtrB. Então, a atividade de quinase de NtrB predomina e NtrC é fosforilada, e assim é capaz de ativar a transcrição de genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de nitrogênio. Já na forma não modificada, GlnB interage com NtrB estimulando a desfosforilação de NtrC, que por sua vez fica inativa (ARCONDEGUY; JACK; MERRICK, 2001).

Em *H. seropedicae* foram encontrados 2 genes que codificam para membros da família PII, *glnB* e *glnK* (BENELLI et al., 1997; NOINDORF et al., 2006). Neste organismo, a proteína GlnD uridilila com mais eficácia a proteína GlnB e essa reação é dependente de ATP e 2-OG e inibida por glutamina (BONATTO et al., 2007). O gene *glnK* faz parte de um operon (*nImAglnKamtB*) cuja expressão é dependente de NtrC e ocorre na falta de nitrogênio. O mutante no gene *amtB* apresentou falha no transporte do metil-amônia (NOINDORF et al., 2006). Já o mutante *glnK* é Nif-, sugerindo que a proteína expressa por esse gene está envolvida direta ou indiretamente na fixação de nitrogênio (NOINDORF et al., 2011).

1.4 Transcrição do gene *nifA*

Na maioria dos organismos diazotróficos a transcrição do gene *nifA* é ativada por NtrC fosforilada e é dependente do fator σ^{54} da RNA polimerase. Em *Klebsiella pneumoniae* a proteína NtrC estabiliza a ligação do complexo da RNA polimerase com o promotor -12/-24 do do gene *nifA* (MINCHIN; AUSTIN; DIXON, 1989). Diferentemente, em *Sinorhizobium meliloti* a proteína responsável pela ativação do gene *nifA* é a FixJ, sendo que a forma mais ativa é a fosforilada (AGRON; DITTA; HELINSKI, 1993). Philip e colaboradores (1990) mostraram que em baixas concentrações de O₂, FixL ativa a transcrição de *nifA*.

A região promotora do gene *nifA* em *H. seropedicae* possui sítios de ligação para NtrC, NifA, IHF (“integration host factors”) e uma região -12/-24 dependente de σ^{54} (SOUZA et al., 2000). A ativação deste gene é dependente de NtrC, porém NifA é capaz de se ligar ao próprio promotor e ativar a transcrição (WASSEM et al., 2002). Neste organismo a deleção do sítio de ligação para IHF levou ao aumento da expressão de NifA, indicando que esses fatores são necessários para a regulação negativa da auto-ativação do gene *nifA* (WASSEM et al., 2002).

1.5 Proteína NifA

A proteína NifA é um ativador de transcrição pertencente a família das EBP (“enhancer binding proteins”) e juntamente com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase ativam a transcrição dos genes *nif*. Esta proteína é capaz de se ligar ao DNA na região UAS (“upstream activator sequence”), reconhecendo a sequência 5'-TGT-N₁₀-ACA-3' (BUCK et al., 2000). Esta sequência está localizada a uma distância de 80 a 150 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição (MORETT; CANNON; BUCK, 1988; MORETT; BUCK, 1988). Em *Bradyrhizobium japonicum* a NifA também é capaz de ativar a transcrição dos genes *nrgA* (N-acetiltransferase), *nrgB* e *nrgC* (hidroxilase), sugerindo que nesses organismos, além de ativar a transcrição dos genes *nif*, ela também é responsável pela ativação de genes induzidos por anaerobiose (NIENABER et al., 2000). Em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* a NifA é responsável pela ativação dos genes *hupSL* que codificam para hidrogenases. O sítio de ligação para este gene (5'-ACAA-N₅-ACAA-N₁₂-TTGT-3') não corresponde ao clássico nos genes *nif* (5'-TGT-N₁₀-ACA-3').

Acredita-se que esta região nos genes *hup* foi adaptado para ser ativado por NifA para coexpressar as hidrogenases e nitrogenase nos nódulos do legume (MARTINEZ et al., 2008).

A ativação da transcrição ocorre quando a proteína NifA se liga a sequência UAS e, através de uma volta no DNA, interage com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase. Após, o ATP é hidrolisado e há a formação do complexo aberto, iniciando a transcrição (DIXON; KAHN, 2004).

Em *H. seropedicae* o gene *nifA* foi identificado e sequenciado por Souza e colaboradores (1991a, 1991b). A proteína expressa por esse gene, a NifA, possui 3 domínios estruturais e dois interdomínios (FIGURA 1). O domínio N-terminal é o menos conservado dos três domínios. Este domínio possui um motivo GAF, que está presente em inúmeras proteínas sensoras e reguladoras, inclusive presente em Bacteria, Archaea e Eucarya (HO; BURDEN; HURLEY, 2000). Em mamíferos, foi demonstrado que a fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos regulados por cGMP contém este motivo e é capaz de ligar pequenas moléculas como o cGMP (HO; BURDEN; HURLEY, 2000). O domínio N-terminal não é essencial para a atividade da proteína porque quando foi removido, a proteína ainda foi capaz de ativar a transcrição, porém perdeu a regulação devido aos níveis de nitrogênio (MONTEIRO et al., 1999a, SOUZA et al., 1999). Ainda, Monteiro e colaboradores (1999b) viram que este domínio é capaz de atuar *in trans* aos outros domínios da NifA e assim restaurar a regulação por nitrogênio.

Arsene e colaboradores (1996) verificaram que em *Azospirillum brasilense* este domínio também não era essencial e exercia uma função inibitória na presença de amônio. Isso também foi visto por Beynon e colaboradores (1988) em *S. meliloti*. Já em *R. leguminosarum* bv. *viciae* esse domínio não está presente na NifA (SCREEN; WATSON; DIXON, 1994). Em *K. pneumoniae* quando este domínio foi deletado, a proteína NifA ficou menos ativa na presença de NifL, sugerindo que a função deste domínio seria no bloqueio da atividade de NifL em condições de desrepressão (DRUMMOND; CONTRERAS; MITCHENALL, 2006).

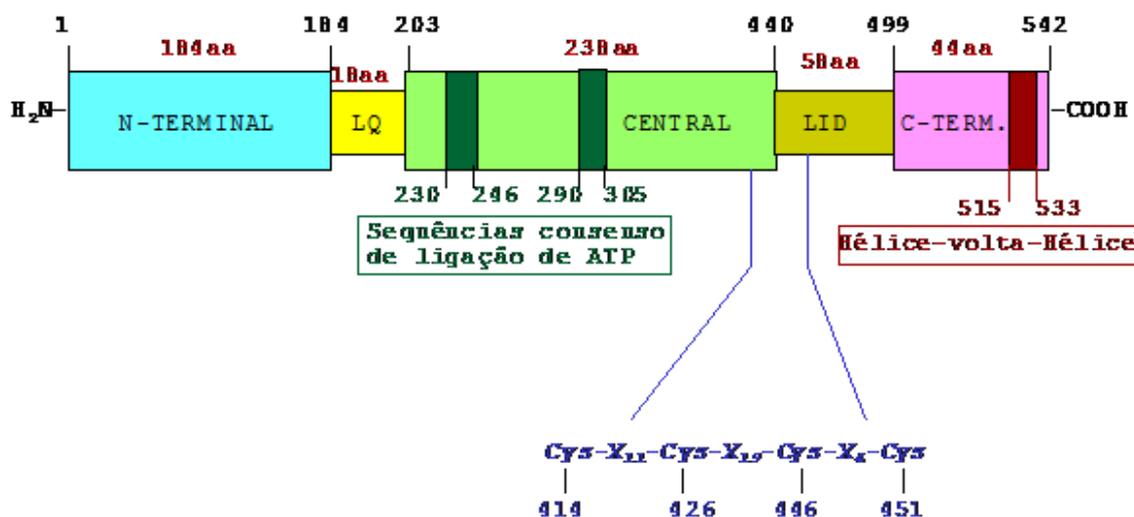


Figura 1: Desenho esquemático da proteína NifA de *H. seropedicae*. Estão representados os 3 domínios estruturais (N-terminal, central e C-terminal) além das duas regiões interdomínios. Os números em vermelho correspondem à posição do aminoácido na proteína. LQ representa a região interdomínios encontrada entre os domínios N-terminal e central, e o LID a sequência interdomínios entre o central e C-terminal. No central, sequências consenso de ligação de ATP são indicadas em verde. O motivo de 4 cisteínas presente no final do domínio central e no início da região interdomínios está evidenciado (MONTEIRO, 2001).

Entre os domínios N-terminal e Central há uma sequência interdomínio, não conservado, chamado Q-linker. Este interdomínio é encontrado em muitas proteínas regulatórias e sensoras como, por exemplo: NtrB, NtrC e NifA (WOOTTON; DRUMMOND, 1989). Ele possui de 15 a 25 aminoácidos e é composto majoritariamente por glutamina, arginina, glutamato, serina e prolina (WOOTTON; DRUMMOND, 1989).

O domínio Central possui atividade de ATPase e é responsável pela ligação e hidrólise do ATP para a formação do complexo aberto. Este domínio é mais conservado que o N-terminal e é essencial para atividade da proteína. Em *K. pneumoniae* esse domínio é suficiente para a transcrição *in vitro* (BERGER; NARBERHAUS; KUSTU, 1994), sendo que possui duas sequências de aminoácidos bem conservadas GAFTGA e ESELF formando dois “loops” que interagem com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase, permitindo que haja a formação posterior do complexo aberto (DAGO et al., 2007).

Alinhamento de várias proteínas NifA mostraram que em organismos onde NifL não foi encontrado, há um motivo de quatro cisteínas bastante conservado na NifA.

Duas dessas cisteínas se encontram na porção C-terminal do domínio central e duas na porção N-terminal do interdomínio LID (FISCHER et al., 1989). Em *B. japonicum* verificou-se que a distância entre essas cisteínas era importante para a atividade da NifA. Na sua forma nativa, a distância entre as cisteínas 472 e 477 é de quatro aminoácidos. Quando essa distância foi diminuída para três, a proteína ficou inativa, já quando aumentou para cinco aminoácidos, a atividade foi parcial (FISCHER et al., 1989).

O domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice que é capaz de se ligar ao DNA em uma região específica (TULI; MERRICK, 1988; MORETT; CANNON; BUCK, 1988; FISCHER; BRUDERER; HENNECKE, 1988; HUALA; AUSUBEL, 1989). Ray e colaboradores (2002) verificaram que em *K. pneumoniae* este domínio possui 3 α -hélices, sendo que as duas últimas formam o motivo conservado hélice-volta-hélice. A interação com o DNA é realizada pela porção N-terminal da segunda hélice e os resíduos de uma das faces da terceira hélice. Em *H. seropedicae*, Monteiro e colaboradores (2003), mostraram que a porção C-terminal liga-se especificamente ao promotor *nifB* e que compete com a proteína N-truncada pelo promotor *nifH* de *K. pneumoniae* em *E.coli*.

1.6 Regulação da Atividade de NifA

A proteína NifA é regulada em resposta a dois sinais ambientais: oxigênio e nitrogênio. Nos diazotrofos existem duas maneiras dessa regulação ocorrer. Na primeira a proteína NifA complexa com NifL, um anti-ativador, inibindo a iniciação da transcrição. Esse mecanismo é encontrado principalmente em bactérias da classe Gammaproteobacteria como, por exemplo, *K. pneumoniae*, *A. vinelandii*, *Pseudomonas stutzeri* e *Enterobacter agglomerans* (XIE et al., 2006; AUSTIN et al., 1994; DIXON, 1998; ANZAI et al., 2000). NifL também foi encontrado em *Azoarcus* sp. estirpe BH72 que é pertencente a classe Betaproteobacteria (EGENER et al., 2002). Na segunda forma de regulação, não há NifL e a proteína NifA sofre auto-regulação. Esse mecanismo é encontrado em *H. seropedicae* e em Alfaproteobacteria como *S. meliloti*, *Rhodospirillum rubrum*, *B. japonicum*, *Azorhizobium caulinodans* e *Azospirillum brasilense* (ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996; NEES; STEIN; LUDWIG, 1988; SOUZA et al., 1991a; HUALA; AUSUBEL, 1989; ZHANG et al., 2000).

1.6.1 Regulação da atividade da NifA em organismos que possuem NifL

Em organismos onde a NifL está presente, é essa proteína que regula NifA dependendo dos níveis de nitrogênio fixado e oxigênio. Essa regulação ocorre por uma interação proteína-proteína entre NifA e NifL (AUSTIN et al., 1994; XIE et al., 2006). Em *A. vinelandii* a proteína NifA purificada é capaz de ativar a transcrição do genes *nif*, porém quando NifL é adicionada, a proteína NifA perde a atividade (AUSTIN et al., 1994). Experimentos de duplo-híbrido em levedura mostraram que o domínio quinase da NifL de *A. vinelandii* interage com o domínio catalítico da NifA, sugerindo que o mecanismo de regulação seria por uma interação entre esses dois domínios (LEI; LAKSHMIDEVI; GAVINI, 1999). Berger e colaboradores (1994) mostraram que em *K. pneumoniae* o domínio central da NifA possui atividade de NTPase mesmo na presença de NifL, porém não é capaz de ativar a transcrição dos genes *nif*. Esse resultado sugere que NifL, ao complexar com NifA, impede o contato com a RNA polimerase.

A formação do complexo NifA-NifL de *A. vinelandii* é dependente de ADP e potencializado na presença do domínio N-terminal da NifA e C-terminal da NifL (MONEY et al., 1999). Na ausência de ADP o complexo é desfeito. Em *K. pneumoniae*, o complexo é formado na presença de nitrogênio e desfeito pela interação da GlnK, não importando seu estado de uridililação (HE et al., 1998; STIPS et al., 2004).

Little e colaboradores (2000) mostraram que a proteína GlnK de *A. vinelandii* não uridililada interage diretamente com NifL e estimula a interação entre NifL e NifA. A interação entre GlnK e NifL é dependente de Mg^{2+} , ATP e 2-OG (LITTLE et al., 2002).

Na presença de nitrogênio fixado, as proteínas do tipo PII são uridililadas e níveis altos de 2-OG desfazem o complexo NifL-NifA. Uma mutação F119S gerou uma NifA de *A. vinelandii* hipersensível à NifL. Isso ocorreu provavelmente porque a NifA mutante não é capaz de se ligar ao 2-OG (MARTINEZ-ARGUDO; LITTLE; DIXON, 2004). Reforçando esse resultado, o complexo feito com NifA N-truncada não foi responsivo à presença de 2-OG (LITTLE; DIXON, 2003), confirmando assim que o domínio N-terminal é o responsável pela ligação desse composto. Reyez-Ramires e colaboradores (2002) obtiveram um mutante NifA Y254N que era

resistente a inibição por NifL em relação aos níveis de nitrogênio e relativamente sensível aos níveis de oxigênio, sugerindo interações diferentes na formação do complexo dependente do tipo de inibição.

A NifL é uma flavoproteína regulatória sensível ao estado redox da célula. Possui o FAD como grupo prostético e na sua forma oxidada, regula negativamente a atividade da NifA (HILL et al., 1996). Na ausência do grupo prostético FAD, NifL foi incapaz de inibir NifA em resposta aos níveis de oxigênio, porém inibiu a atividade da NifA na presença de ADP (HILL et al., 1996).

Em *K. pneumoniae*, NifL não liga Fe, no entanto, na ausência desse elemento, NifL inibe NifA mimetizando condições de não fixação. A regulação é retomada quando se adiciona Fe no meio. Uma vez que neste organismo nem NifL nem NifA requerem esse metal, acredita-se que outra proteína ligante de Fe, seja necessária para desfazer a inibição de NifL sobre NifA (SCHMITZ; HE; KUSTU, 1996). A proteína FNR é uma proteína candidata para esse papel. Ela é responsável pelo sensoriamento primário de oxigênio e na ausência dela, NifL inibe permanentemente NifA. Portanto FNR pode estar diretamente interagindo com NifL e repassando esse sinal ou ativando a transcrição de outras proteínas que realizam essa tarefa (GRABBE; KLOPPROGGE; SCHMITZ, 2001).

Klopprogge e colaboradores (2002) verificaram que na ausência de nitrogênio fixado e oxigênio, cerca de 55% do total de NifL era encontrada na fração de membrana e que na presença desses dois elementos, apenas 10% estava na membrana. Nos mutantes *fnr* e *glnK/amtB*, mesmo em condições de fixação de nitrogênio, a proteína NifL se encontrava no citoplasma inibindo NifA, sugerindo que as proteínas FNR, GlnK e AmtB são importantes na desestabilização do complexo NifL-NifA.

O mecanismo proposto por Grabbe e colaboradores (2003) para regulação da NifL sugere que um “pool” de quinonas reduzidas, geradas da cadeia respiratória anaeróbica, iriam reduzir o FAD da NifL, favorecendo sua ligação na membrana. NifL estando na membrana não iria interagir com a proteína NifA, que estaria sempre no citoplasma e ativa.

1.6.2 Regulação da atividade da NifA em organismos que não possuem NifL

Em muitos diazotrofos o gene *nifL* não está presente, sugerindo que a regulação de NifA ocorre de uma outra forma. Em *A. brasilense* e *R. rubrum* a proteína NifA é sintetizada não importando a condição fisiológica da bactéria, porém só é ativa na ausência de nitrogênio. Nestes organismos a presença da proteína GlnB é essencial para a ativação da proteína NifA (ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996; ZHANG et al., 2000, ARAÚJO et al., 2004). Ainda, em *A. brasilense*, a NifA sem o domínio regulatório N-terminal ou contendo as mutações Y18F ou Y53F é ativa em condições de fixação de nitrogênio mesmo na ausência de GlnB (ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1999; CHEN et al., 2005). Quando as duas mutações (Y18F e Y53F) são combinadas a proteína é mais ativa em condições de fixação de nitrogênio, no entanto não apresenta atividade na presença de nitrogênio fixado. Nos mutantes simples, GlnB ainda é capaz de se ligar a NifA, porém com menor afinidade, já no mutante duplo essa interação não ocorre (CHEN et al., 2005). A proteína GlnB na sua forma uridililada também é necessária para ativar NifA em *R. rubrum* (ZHANG; POLHMANN; ROBERTS, 2004).

Em *H. seropedicae* foi mostrado que a proteína responsável pela ativação da NifA é a proteína GlnK e não GlnB (NOINDORF et al., 2011). Também, experimentos utilizando uma proteína quimera NifAQ1, que possui o domínio N-terminal GAF da proteína NifA de *H. seropedicae* e domínios Central+C-terminal da NifA de *Azotobacter vinelandii* (FIGURA 2), é ativa em *E. coli* e responde parcialmente ao nitrogênio. Além disto, GlnK é capaz de ativar NifAQ1 em baixos níveis de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 2012). Ensaio de proteólise parcial sugerem que a proteína GlnK seja capaz de proteger o domínio GAF tanto na forma uridililada quanto na não modificada (OLIVEIRA et al., 2012). Neste organismo verificou-se que as duas formas podem se ligar na NifA, porém apenas a forma uridililada é capaz de desinibir essa proteína quando a concentração de nitrogênio fixado está baixa.

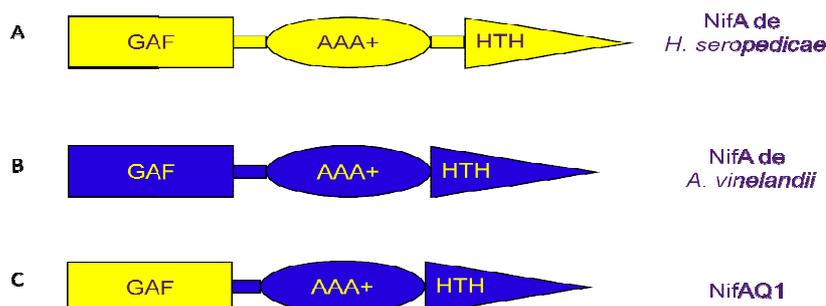


Figura 2: Desenho esquemático das proteínas NifA de *H. seropedicae* e *A. vinelandii* e da proteína quimérica NifAQ1. GAF, AAA+ e HTH indicam os domínios N-terminal, Central e C-terminal, respectivamente. Estes domínios podem ou não estar conectados por regiões interdomínio. **(A)** Proteína NifA de *H. seropedicae*. **(B)** Proteína NifA de *A. vinelandii*. A proteína NifAQ1 **(C)** é uma quimera entre as NifAs de *A. vinelandii* (azul) e *H. seropedicae* (amarelo).

Em *Rhodobacter capsulatus*, uma bactéria fotossintética, há 2 genes *nifA* (*nifA1* e *nifA2*). Os produtos dos genes *nifA1* e *nifA2* diferem apenas no domínio N-terminal e sua expressão ocorre moderadamente mesmo na presença de nitrogênio e oxigênio. Apesar disso não foi detectado a expressão dos genes *nifH* e *nifR4*, dependentes de NifA, sugerindo que neste organismo pode existir algum mecanismo de regulação pós-traducional de NifA (HUBNER et al., 1991). Paschen e colaboradores (2001) mostraram que a NifA1 sem o domínio N-terminal é inativa, indicando que esse domínio é essencial para a atividade desta proteína. As mutações pontuais (V42E; L66Q; I460F e E477Q) levaram a uma proteína tolerante à amônia, sugerindo que esses aminoácidos participam da regulação desta proteína.

Pawlowski e colaboradores (2003) observaram que em *R. capsulatus* a proteína GlnB é capaz de se ligar a NtrB, NifA1, NifA2 e DraT, já a proteína GlnK é capaz de se ligar a NifA1, NifA2 e DraT. Neste organismo a presença das proteínas GlnB e GlnK é essencial para a regulação negativa em relação aos níveis de nitrogênio fixado, uma vez que quando elas não estavam presentes a NifA perdeu a regulação por amônio (DREPPER et al., 2003).

A NifA de *S. meliloti*, sem o motivo de ligação ao DNA, ainda foi capaz de ativar a transcrição de *nifH*, no entanto a atividade diminuiu. Já quando o domínio N-terminal foi removido, a atividade foi pouco alterada em relação aos níveis de nitrogênio e não sofreu nenhuma alteração em relação aos níveis de oxigênio (HUALA; AUSUBEL, 1989). Em *H. seropedicae* a deleção do domínio N-terminal da NifA não afetou a capacidade de ativar a transcrição do gene *nifH*, no entanto fez

com que ela perdesse a regulação por amônio (MONTEIRO et al., 1999a). Monteiro e colaboradores (1999b) co-expressaram *in trans* o domínio N-terminal e a proteína N-truncada de *H. seropedicae* e verificaram que a regulação por nitrogênio era recuperada. Além disso, experimentos de proteólise mostraram que o domínio N-terminal consegue proteger a proteína N-truncada, essa interação também impede a ligação ao DNA do domínio C-terminal e atividade ATPásica do domínio Central (MONTEIRO et al., 1999b).

A regulação por oxigênio de proteínas NifA independente de NifL ainda não é muito compreendida. Fischer e colaboradores (1988) em *B. japonicum*, mostraram que um “cluster” de cisteínas localizados na porção final do domínio central e na região interdomínio LID é essencial para a atividade da proteína NifA. Substituição sítio-dirigida das cisteínas por serinas levaram a uma proteína NifA inativa, já quando essas mutações foram revertidas, a proteína voltou a ser ativa. Em *H. seropedicae*, Oliveira e colaboradores (2009) realizaram as mesmas mutações individuais nas cisteínas, o que levou a uma NifA inativa, porém ainda com capacidade de se ligar ao DNA.

Na ausência de oxigênio a proteína NifA de *B. japonicum* é capaz de se ligar ao UAS e formar o complexo aberto com σ^{54} . Já na presença de oxigênio ou na ausência do íon ferro a NifA é rapidamente degradada (MORETT; FISCHER; HENNECKE, 1991).

Estudos realizados em *S. meliloti* com a proteína NifA mutante M217I mostrou que essa mutação gera uma proteína tolerante ao oxigênio, e o modelo proposto pelos autores sugere que em altas concentrações de oxigênio ocorre uma mudança conformacional no sítio de ligação de nucleotídeo que impede a ligação e/ou a hidrólise de ATP (KREY; PUHLER; KLIPP, 1992). Com a mutação, essa mudança de conformação não ocorre, fazendo com a proteína fique ativa mesmo na presença de oxigênio (KREY; PUHLER; KLIPP, 1992). Na NifA de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, que não possui domínio N-terminal, a adição de 30 aminoácidos nesta região fez com que essa proteína fosse tolerante ao oxigênio (SCREEN; WATSON; DIXON, 1994).

O modelo proposto para a regulação por oxigênio é que na forma reduzida íons ferro complexam com cisteínas formando um cluster, permitindo a interação correta

dos domínios central e C-terminal, fazendo com que a NifA fique na sua forma ativa. Já quando o ferro é oxidado, essa conformação é alterada tornando a NifA inativa.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

A proteína NifA é o elemento central na regulação da expressão dos genes *nif*. Esta regulação é bem estudada em organismos onde NifL está presente, porém ainda não é bem compreendida em organismo onde NifL está ausente. Um dos aspectos relevantes é determinar o papel de alguns resíduos de aminoácidos nesta regulação envolvendo não apenas a interação intramolecular entre os domínios da proteína NifA, como também as interações intermoleculares entre NifA e a proteína transdutora de sinal GlnK.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

- Realizar mutações pontuais e analisar seu efeito na regulação da proteína NifA de *H. seropedicae*.

2.2.2 Objetivos específicos

- Construir mutantes no gene *nifA* nas estirpes SmR1 e LN_{GlnK}del de *H. seropedicae*;
- Construir fusões cromossomais *nifH::lacZ* nas estirpes de *H. seropedicae*;
- Construir genes *nifA* com mutações sítio dirigidas e analisar sua capacidade de ativar a transcrição de genes *nif* em *E. coli* e *H. seropedicae*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias e Plasmídeos

As bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Bactérias e Plasmídeos.

Estirpe	Fenótipo/Genótipo	Referência
Estirpes de <i>E. coli</i>		
TOP 10	F ⁺ <i>mcrA</i> Δ(<i>mvr</i> – <i>hrd RMS</i> – <i>mcrBC</i>) φ 80 <i>lacZ</i> ΔML5 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ(<i>ara</i> – <i>leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Sm ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
JM109 (DE3)	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> ΔM15] (JM109 produtora da RNA polimerase do fago T7)	Promega
S17.1	Sm ^R , <i>tra+</i> <i>pro thi recA hsdR</i> (RP4-2 <i>kan::Tn7 tet::Mu</i>)	SIMON; PRIEFFER; PUHLER, 1983
Estirpes de <i>H. seropedicae</i>		
SmR1	Sm ^R , Nif ⁺ .	SOUZA et al., 1995
LNginKdel	Sm ^R , SmR1 contendo deleção em fase de 192 nucleotídeos do gene <i>ginK</i>	NOINDORF et al., 2011
NifAdel	Sm ^R , SmR1 contendo deleção de 750 nucleotídeos do gene <i>nifA</i>	Este trabalho
NifAdel/GlnKdel	Sm ^R , LNginKdel contendo deleção de 750 nucleotídeos do gene <i>nifA</i>	Este trabalho
SmR1::<i>lacZ</i>	Sm ^R , Km ^R , Nif ⁺ , contendo uma fusão <i>nifH::lacZ</i>	Este trabalho
NifAdel::<i>lacZ</i>	Sm ^R , Km ^R , Estirpe NifAdel contendo uma fusão <i>nifH::lacZ</i>	Este trabalho
NifAdel/GlnKdel::<i>lacZ</i>	Sm ^R , Km ^R , Estirpe NifAdel/GlnKdel contendo uma fusão <i>nifH::lacZ</i>	Este trabalho
Plasmídeos		
pTZ18R	Amp ^R , Vetor multifuncional de clonagem e sequenciamento, promotor <i>lac</i> .	MEAD; SZCZENA-SKORUPA; KEMPER, 1986
pRT22	Cm ^R , <i>K. pneumoniae nifH::lacZ</i> .	TULI; MERRICK, 1988
pLAFR 3.18	Cm ^R , Tc ^R , Mob ⁺ , vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R.	SOUZA et al., 1999
pMH1701	Km ^R , contém cassete <i>sacB-Km^R</i>	HYNES et al., 1989
pKOK 6.1	Amp ^R , Cm ^R , Km ^R , contém o cassete <i>lacZ-Km^R</i> sem promotor	KOKOTEK; LOTZ, 1989

pET29a	Km ^R , Vetor de expressão. Expressa uma proteína com uma cauda de Histidinas/promotor T7.	Novagen
pT7-7	Amp ^R , Vetor de expressão/promotor T7.	Biolabs
pCR 2.1	Amp ^R , Km ^R , Vetor de clonagem.	Invitrogen
ppnifAN185	Tc ^R , Expressa a proteína NifA, com uma deleção de 185 aminoácidos no domínio N-terminal, a partir do promotor <i>nifA</i> , clonada no vetor pLAFR3.18.	Adriano Alves Stefanelo (Dados não publicados)
pRAMM1	Tc ^R , Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> subclonada no vetor pLAFR3.18.	NOINDORF et al., 2011
pRAM1	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> subclonada no vetor pET29a.	MONTEIRO et al., 1999a
pRAM2	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> sem os primeiros 203 resíduos de aminoácidos subclonada no vetor pET29a.	MONTEIRO et al., 1999a
pBA3	Amp ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> sem 750pb da porção central, derivada do plasmídeo pRAM1T7.	Este trabalho
pBA4	Amp ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> sem 750pb da porção central com um cassete <i>sacB::Km</i> , derivada do plasmídeo pBA3.	Este trabalho
pET-K22V	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação K22V clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-G25E	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação G25E clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-T160E	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação T160E clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-M161V	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação M161V clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-L172R	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação L172R clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-A215D	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação A215D clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-Q216I	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação Q216I clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-S220I	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação S220I clonada no vetor pET29a.	Este trabalho

pET-ΔA215D	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> sem os 203 primeiros resíduos de aminoácidos com a mutação A215D clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-ΔQ216I	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> sem os 203 primeiros resíduos de aminoácidos com a mutação Q216I clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pET-ΔS220I	Km ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> sem os 203 primeiros resíduos de aminoácidos com a mutação S220I clonada no vetor pET29a.	Este trabalho
pLAFR-K22V	Tc ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação K22V clonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pLAFR-G25E	Tc ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação G25E clonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pLAFR-T160E	Tc ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação T160E clonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pLAFR-M161V	Tc ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação M161V clonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pLAFR-L172R	Tc ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação L172R clonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pLAFR-A215D	Tc ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação A215D clonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pLAFR-Q216I	Tc ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação Q216I clonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pLAFR-S220I	Tc ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> com a mutação S220I clonada no vetor pLAFR3.18.	Este trabalho
pRAM1 T7	Amp ^R , Contém a sequência codificadora da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> subclonada no vetor pT7-7.	Rose Monteiro (Dados não publicados)
pLAU1	Amp ^R , Contém cerca de 5,3kb da região promotora e parte do gene <i>nifH</i> clonados no vetor pTZ18R.	RONCATO-MACCARI, 2003
pTZnifH:lacZ	Amp ^R , Km ^R , Contém uma fusão <i>nifH:lacZ</i> derivada do vetor pLAU1.	Este trabalho

3.2 Meios de cultura

As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C no meio líquido LB (Luria-Bertani) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e a 30°C no meio mínimo NFDM (Nitrogen-Free Davis e Mingioli) (CANNON; DIXON; POSTGATE, 1974). Para cultivo em meio sólido foi utilizado o LA (Luria-Bertani Agar) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP-Malato (KLASSEN et al., 1997). A fonte de nitrogênio utilizada foi NH₄Cl 20mmol/L ou glutamato 0,5 mmol/L (ensaio da nitrogenase). Para cultivo em meio sólido, 15 g/L de ágar foram adicionados ao meio líquido.

3.3 Transformação Bacteriana

3.3.1 Células Termocompetentes

A transformação bacteriana foi feita utilizando células termocompetentes. Para isso, um pré-inóculo de 3 mL da célula foi crescido sob agitação por aproximadamente 16 horas em meio líquido LB, com os antibióticos adequados. O inóculo foi feito na proporção 1:100 em 5 mL de LB e crescidos até uma DO₆₀₀ entre 0,3 e 0,5. A cultura foi mantida por 10 minutos no gelo e alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 6000 rpm durante 90 segundos. As células foram ressuspensas em 100 µL de solução TSS (CHUNG; NIEMELA; MILLER, 1989). Para a transformação, 1 a 2 µL de DNA plasmidial (aproximadamente 20 ng) foram adicionados a 100 µL de células termocompetentes e incubadas em gelo por 30 minutos. Um choque térmico de 90 segundos a 42°C foi feito seguido de incubação em gelo por 2 minutos. As células foram recuperadas em meio LB à 37°C, durante 1 hora.

Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo os antibióticos apropriados.

3.3.2 Células Eletrocompetentes

As estirpes de *H. seropedicae* foram pré-inoculadas em meio NFbHP-Malato contendo cloreto de amônio e os antibióticos adequados. Após crescidas foram

diluídas na proporção 1:100 em meio NFbLP-Malato contendo 20 mol/L de cloreto de amônio e 1:10 de fosfato, essa cultura foi crescida a 30°C por 16 horas sob agitação. As células foram incubadas por 20 minutos em gelo seguida de centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm a 4°C. O meio foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com água bidestilada gelada estéril. As células foram ressuspensas em glicerol gelado 15% e alíquotas de 100 µL foram estocadas.

A transformação das células eletrocompetentes foi feita utilizando cerca de 5 µL de DNA purificado (aproximadamente 50 ng). O DNA foi adicionado a alíquota de células e transferido para uma cubeta de eletroporação, foi então aplicado um choque elétrico nas células utilizando o eletroporador GenePulser II (Bio-Rad). Em seguida as células foram recuperadas em 1 mL de NFbHP-Malato contendo fosfato e cloreto de amônio por 3 horas e plaqueadas em meio NFbHP-Malato sólido contendo os antibióticos adequados.

3.4 Purificação do DNA plasmidial

O isolamento do DNA plasmidial foi feito segundo o método de lise alcalina descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Um e meio mililitro de uma cultura de células crescidas por aproximadamente 16 horas foram centrifugados durante 1 minuto a 13400 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspendido em 150 µL de tampão GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl pH 8,0 25 mmol/L). A lise foi realizada adicionando-se 150 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e 1% de SDS. Essa mistura foi homogeneizada delicadamente por inversão. O DNA cromossomal, proteínas e o SDS foram precipitados por adição de 150 µL de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L. Essa mistura foi homogeneizada por inversão e mantida por 10 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13400 rpm, e o sobrenadante contendo o plasmídeo foi separado em outro tubo, descartando-se o precipitado. A essa solução foi adicionado 100 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura resultante foi agitada para homogeneização e centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa foi coletada e misturada a 3 volumes de etanol absoluto, com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13400 rpm, e o

sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em estufa 37°C e dissolvido em 30 µL de água bidestilada autoclavada.

3.5 Eletroforese de DNA e de Proteína

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1%, segundo protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Os géis foram preparados com tampão TBE (Tris-base 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8,0) e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão. O DNA foi visualizado, após incubação do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em transiluminador de luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema vídeo-imagem acoplado (UVP).

A eletroforese de proteína em gel desnaturante foi realizada segundo Laemmli (1970). O gel de poli(acrilamida) desnaturante continha duas fases. A fase de empilhamento foi feita na concentração de 4% (m/v) de poli(acrilamida) e a fase de separação na concentração de 12%. As eletrofereses foram realizadas em sistema vertical (BioRAD). O tampão de amostra (TA) continha (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8 e 5% de β-mercaptoetanol) e antes de aplicar no gel, as amostras juntamente com o TA foram fervidos. O tampão de corrida utilizado foi o Laemmli (3 g/L de Tris-Base, 14 g/L de glicina e 1 g/L de SDS) e após a eletroforese os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 e descorados em água destilada. Os géis foram fotografados utilizando o sistema vídeo-imagem acoplado (UVP).

3.6 Conjugação Bacteriana

Os plasmídeos a serem conjugados foram transformados em estirpe S17.1 (tra+) de *E. coli*. As estirpes de *H. seropedicae* e *E. coli* foram inoculadas em NFbHP-malato e LB, respectivamente, e crescidas até DO₆₀₀ de aproximadamente 0,7. Alíquotas de 50 µL da cultura de *H. seropedicae* foram misturadas com 5 µL da cultura de *E. coli* e plaqueadas como gota em placa contendo NFbHP-malato sólido suplementado com 20 mmol/L de NH₄Cl e LA na proporção de 3:1. Após 20 horas de crescimento, a massa de células foi raspada e plaqueadas em NFbHP-malato contendo 20 mmol/L de cloreto de amônio e antibióticos adequados. As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias.

3.7 Construção dos mutantes no gene *nifA*

3.7.1 Construção do plasmídeo pBA3 e pBA4

O plasmídeo pRAM1T7, foi digerido com a enzima *EcoRI* para se retirar um fragmento de aproximadamente 750 pb da região central do gene *nifA*, como mostrado na figura 3. O plasmídeo foi re-ligado, dando origem ao plasmídeo pBA3. Em seguida o cassete *sacB::Km*, retirado do plasmídeo pMH1701 após restrição com a enzima *BamHI*, foi clonado no sítio *BamHI* do plasmídeo pBA3, originando o plasmídeo pBA4.

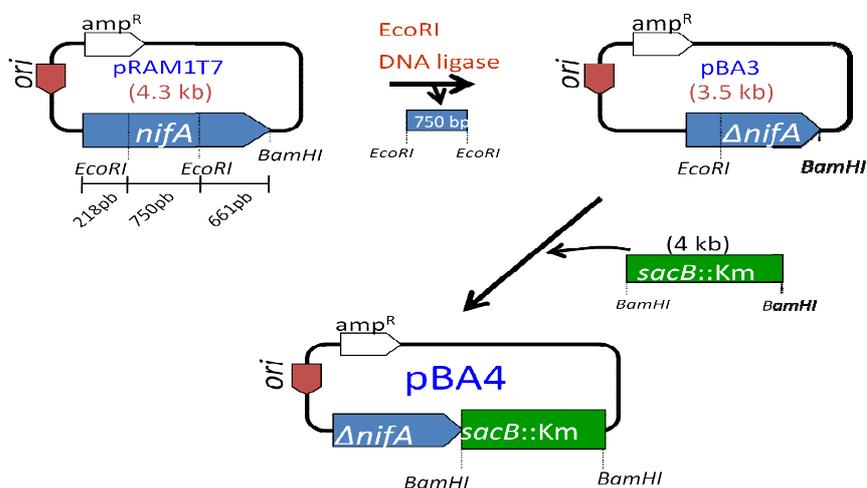


Figura 3: Esquema da construção dos plasmídeos pBA3 e pBA4. O gene *nifA*, clonado no vetor pRAM1T7, foi digerido com *EcoRI* e perdeu cerca de 750pb da região central, após ligado deu origem ao plasmídeo pBA3. Logo em seguida, o cassete *sacB::Km* foi inserido, utilizando a enzima *BamHI*, dando origem ao plasmídeo pBA4.

3.8 Construção da fusão *nifH::lacZ*

3.8.1 Construção do plasmídeo contendo a fusão *nifH::lacZ*

A construção da fusão *nifH::lacZ* foi iniciada com a digestão do plasmídeo pLAU1 (RONCATO-MACARI, 2003) com a enzima *BamHI*. Este plasmídeo contém parte do gene *nifH* de *H. seropedicae* e sua região promotora, totalizando cerca de 5,3 kb clonados no vetor pTZ18R. Também foi digerido o vetor pKOK6.1 com a mesma enzima para liberar o cassete *lacZ::Km*, após a digestão a banda referente ao cassete foi purificada do gel de agarose. O vetor contendo o promotor do gene

nifH e o fragmento contendo o cassete *lacZ:Km* foram ligados gerando o plasmídeo pTZnifH:*lacZ* (FIGURA 4).

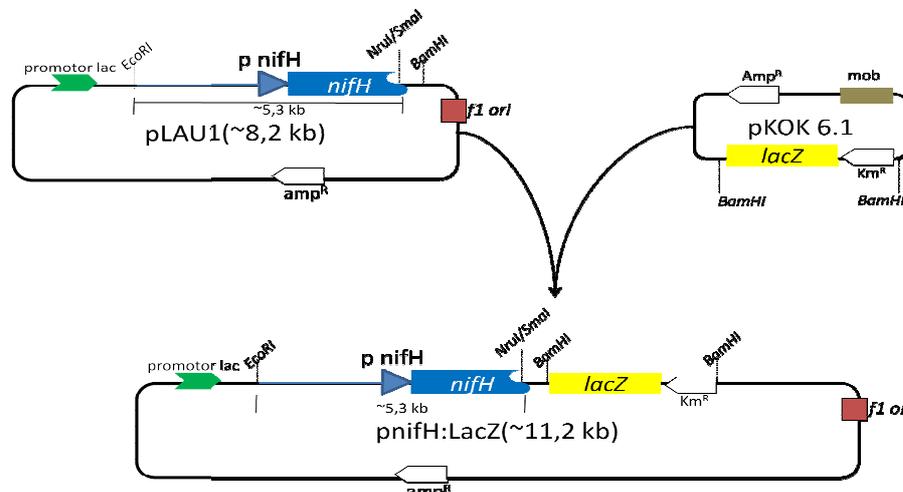


Figura 4: Esquema da construção da fusão *nifH(H. seropedicae)::lacZ* no vetor pTZ18R. A fusão *nifH(H seropedicae)::lacZ* foi construída a partir do plasmídeo pLAU1. Foi inserido no sítio *BamHI* o cassete *lacZ:Km*, originado do vetor pKOK6.1.

3.8.2 Obtenção das estirpes de *H. seropedicae* com a fusão *nifH::lacZ* cromossomal

O vetor contendo a fusão *nifH::lacZ* foi eletroporado nas estirpes SmR1, NifAdel, LNginKdel e NifAdel/GlnKdel de *H. seropedicae*. Os transformantes foram selecionados em meio NFbHP-malato com canamicina (1000 µg/mL). A inserção correta deste plasmídeo no genoma de *H. seropedicae* foi confirmada conjugando o plasmídeo ppnifAN185, que expressa a NifA sem o domínio N-terminal a partir do promotor *nifA*, nas estirpes obtidas. Esses conjugantes foram plaqueados em NFbHP-malato com X-gal (30 µg/mL) e as culturas que geraram colônias com coloração azul foram selecionadas.

3.9 Mutagênese sítio-dirigida da proteína NifA de *H. seropedicae*

A seleção dos aminoácidos para mutagênese foi iniciada com o alinhamento das proteínas NifA de *H. seropedicae*, *R. rubrum*, *S. meliloti*, *R. capsulatus*, *K. pneumoniae*, *Azoarcus sp*, *A. vinelandii*, *B. japonicum* e *A. brasilense* (FIGURA 5) utilizando o programa ClustalW Multiple Alignment. Abaixo, estão destacados em

vermelho os aminoácidos selecionados para a mutação sítio-dirigida (FIGURA 5). Dos organismos escolhidos, apenas *K. pneumoniae*, *Azoarcus sp.* e *A. vinelandii* possuem NifL e estão localizados nas três últimas linhas de cada quadro.

	Regiões do domínio N-terminal				Região do domínio central	
	20	25	160	170	215	220
Herbaspiri	TIYEISKILGSSL	...	RLLTMVANLIGQTVRLYRS	...	EVFAQVHQ SAPS	
Azospirill	TIYEVSKILGSSL	...	RFLTMVANLIGQTVRLHRT	...	EVMAQVHRVAPF	
Bradyrhizo	GIYEISKILNAPG	...	RLLAMVANVIGQTIKHLRL	...	ALLEKIVV VARS	
Rhodobacte	ALYEIAKTF AAP	...	RVLTMVASLLEQALRFRRL	...	EVVAQIKRVAST	
Rhodospiri	TLYEVSKILGSTL	...	RFLTMVATLIAQTVSLERR	...	KISAQVRQIAPS	
Sinorhizob	EIYSISKALMAPT	...	HFLSMAANLAGRAIRLHRT	...	TAVDTAKVMAET	
Azotobacte	ALASIA RTLSREQ	...	RLLEIVANLLAQTVRLVVN	...	RVFDQIRRVAKW	
Azoarcus s	ALYRVSRVLSRSL	...	HFAEMVANLVGQTVRLSCQ	...	QVFEQIRQVAKW	
Klebsiella	AMQRISV VLSRAT	...	RFL ETVANLVAQTIRLMIL	...	QIVEVIRQVSRW	

Figura 5: Alinhamento dos aminoácidos de partes da proteína NifA de vários diazotrofos. Foi utilizado o programa ClustalW Multiple Alignment. Os aminoácidos escolhidos para a mutação estão marcados em vermelho e apenas a região onde eles se encontram estão mostradas. A numeração é referente ao aminoácido da proteína NifA de *H. seropedicae*. Os organismos que possuem NifL estão destacados em negrito.

Para a obtenção das mutações pontuais sítio-dirigidas foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores contendo as mutações. A amplificação dos genes mutagenizados foi realizada em duas etapas como mostrado na figura 6. Na primeira, duas reações de PCR para cada mutação foram feitas. Em uma delas os “primers” utilizados foram o NifA1 e os “primers” mutagênicos reverso (TABELA 2), em outra, foram utilizados o “primer” NifA2a e os “primers” mutagênicos universal (TABELA 2). O produto de PCR dessas duas reações foram purificados e utilizados como molde em uma terceira reação de PCR. Nesta PCR os “primers” utilizados foram o NifA1 e NifA2A e o anelamento entre as duas partes do gene *nifA* permitiu que o gene inteiro fosse amplificado e com a mutação correspondente.

Tabela 2: “Primers” mutagênicos utilizados na construção dos genes *nifA* mutados.

Nome do “primer”	Sequencia (5’-3’)*	Sentido**
HSNifA1	TAGGGATCCCATATGGCCACT	Universal
HSNifA2a	AGAGGATCCTCAGAACTTCTT	Reverso
K22V F	AGATCAGC GT GATATTGGG	Universal
G25E F	AAGATATTGG AG TCATCGCTG	Universal
T160E F	CCTGCTG GAG ATGGTG	Universal
M161V F	CTGCTGAC CGT CGTG	Universal
L172R F	CGGC TT TATCGCAGC	Universal
A215D F	GTGTT CGAC CAGGTACAC	Universal
Q216I F	GCG ATA GTACACCAGTCC	Universal
S220I F	ACACCAG AT CGCCCC	Universal
K22V R	CCCAATAT AC GCTGATCT	Reverso
G25E R	CAGCGATG ACT CCAATATCTT	Reverso
T160E R	CACCAT CTC CAGCAGG	Reverso
M161V R	CAC GAC GGTCAGCAG	Reverso
L172R R	GCTGCGATA AC GCCG	Reverso
A215D R	GTGTACCTG GT CGAACAC	Reverso
Q216I R	GGA CT GGTGTACT TAT CGC	Reverso
S220I R	GGGCG AT CTGGTGT	Reverso

*Alterações de códons estão indicados em vermelho na sequência dos “primers”

** Indica o sentido de extensão da cadeia

Após a amplificação por PCR, o fragmento foi digerido com *NdeI/BamHI* e clonado no vetor pET29a para análise da atividade em *E. coli* estirpe JM109(DE3). Para estudos nas estirpes de *H. seropedicae* foi necessário clonar esse gene no vetor pLAFR3.18.

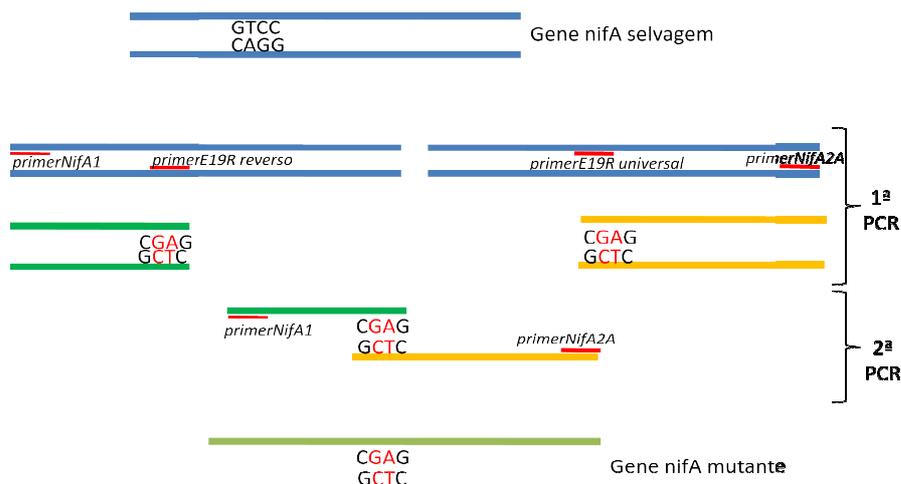


Figura 6: Estratégia para inserção de mutações sítio dirigidas no gene *nifA*. Na primeira amplificação, utilizando “primers” mutagênicos, foi amplificado o gene em duas metades. Na segunda, o gene *nifA* foi amplificado por inteiro, utilizando como DNA molde as duas metades do gene da primeira PCR.

Na tabela abaixo (TABELA 3) está representado na primeira coluna as mutações selecionadas, indicando a troca de aminoácidos que foi feita, e o número indica a posição desta mutação na proteína NifA de *H. seropedicae*. Na segunda coluna a origem da mutação e na terceira o fenótipo apresentado pelos mutantes que foram selecionados da literatura indicada na coluna 4.

Tabela 3: Mutação, origem e fenótipo das mutações realizadas na proteína NifA.

Mutação	Origem	Fenótipo	Referência
K22V	Conservado	Não determinado	Este Trabalho
G25E	<i>R. rubrum</i> – G36E	NifA ativa em mutante <i>glnB</i>	ZOU et al., 2008
T160E	Conservado	Não determinado	Este Trabalho
M161V	<i>R. rubrum</i> – M173V	NifA interage melhor com GlnB	ZOU et al., 2008
L172R	<i>R. rubrum</i> – L184R	NifA ativa em mutante <i>glnB</i>	ZOU et al., 2008
A215D	Conservado	Não determinado	Este Trabalho
Q216I	Conservado	Não determinado	Este Trabalho
S220I	<i>S. meliloti</i> – S217I	NifA resistente ao oxigênio	KREY; PUHLER; KLIPP, 1992

3.10 Ensaio de ativação de transcrição das fusões *nifH::lacZ*

3.10.1 Ensaio de β -galactosidase das proteínas NifA em *E. coli*

Os ensaios de β -galactosidase foram realizados segundo Miller (1992). A estirpe JM109(DE3) contendo o plasmídeo pRT22 (fusão *nifH::lacZ* de *K. pneumoniae*) foi transformada com os plasmídeos contendo a NifA inteira (pRAM1), NifA N-truncada (pRAM2) e com os plasmídeos contendo as mutantes de NifA expressas a partir do vetor pET29a. Essas culturas foram crescidas em LB e 100 μ L desta cultura foram pré-inoculadas em 4 mL de NFDM contendo 0,02% de casaminoácidos e os antibióticos apropriados e cresceram durante a noite sob agitação de 120rpm à 30°C. Essas culturas foram diluídas para uma DO₆₀₀ inicial de 0,1 em NFDM contendo 20 mmol/L de NH₄Cl (condição N+) ou casaminoácidos 0,02% (condição N-), o meio foi ainda suplementado com 5 μ g/ml de tiamina e 0,5 mmol/L de IPTG. As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação na ausência de oxigênio.

Após 16 horas de crescimento a atividade de β -galactosidase foi determinada. O sistema de reação continha 900 μ L de tampão Z (Na₂HPO₄ 60 mmol/L, NaH₂PO₄.7H₂O 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO₄.7H₂O 1mmol/L, β -mercaptoetanol 50mmol/L e SDS 0,0027%), 100 μ L de suspensão de células e 20 μ L de clorofórmio. A reação foi iniciada com a adição de 200 μ L de ONPG (4mg/ml) e parada com 500 μ L de Na₂CO₃ (1 mol/L). Após uma centrifugação por 10 min o sobrenadante foi recolhido e a absorbância, no comprimento de onda 420 nm da reação, foi medida. Também, a absorbância em 600nm da cultura foi medida para o cálculo da atividade segundo fórmula abaixo.

$$\text{Atividade de } \beta\text{-Gal} = \frac{1000 \times \text{Abs}_{420\text{nm}}(\text{da reação})}{t \times V \times \text{Abs}_{600\text{nm}}(\text{da cultura})}$$

Onde:

t = tempo de incubação (minutos)

V = volume de células utilizadas (mL)

Abs = Absorbância no comprimento de onde indicado.

3.10.2 Determinação da atividade de β -galactosidase das proteínas NifA N-truncadas em *E. coli*

Os ensaios com as proteínas NifA N-truncadas foram realizados na mesma estirpe que as NifAs inteiras, no entanto a condição de crescimento do experimento foi alterada. As culturas contendo os plasmídeos pRT22 e pET29a expressando as NifAs N-truncadas foram crescidas em LB e 100 μ L dessa cultura foi utilizada como inóculo para crescimento em NFDM contendo 5% de LB e 0,02% de casaminoácidos e os antibióticos apropriados. O pré-inóculo em NFDM foi diluído para uma DO_{600} de 0,2 em NFDM contendo NH_4Cl , para condição N+, e 0,02% de casaminoácidos para condição N- e a expressão da proteína foi induzida com a adição de 0,5 mmol/L de IPTG. O frasco foi selado e a cultura cresceu em anaerobiose (condição O-) ou em aerobiose (condição O+) por 8 horas a 30°C. A reação de β -galactosidase e o cálculo da atividade foram feitos seguindo o mesmo protocolo/fórmula utilizado para a NifA inteira (3.6.1).

3.10.3 Determinação da atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae*

As estirpes de *H. seropedicae* NifAdel e NifAdel/GlnKdel contendo a fusão cromossomal *nifH:lacZ* foram conjugadas com os plasmídeos pRAMM1 (expressa NifA selvagem) e pLAFR-G25E (expressa NifA mutada no aminoácido 25). Essas estirpes, juntamente com a estirpe selvagem SmR1 contendo a fusão cromossomal *nifH:lacZ*, foram crescidas em meio NFbHP-malato com 5 mmol/L de glutamato. Após crescimento, essas culturas foram diluídas para uma DO_{600} de 0,05 em 8mL de NFbHP-malato contendo 2 ou 20 mmol/L de NH_4Cl . Após 24 horas de crescimento 100 μ L de células foram retirados para determinar a atividade de β -galactosidase segundo Miller (1992).

3.11 Determinação da atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método da redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN; BURRIS, 1967). As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em frasco de 10 mL contendo 4 mL de meio NFbHP semi-sólido e 0,5 mmol/L de glutamato. Após a formação da película próxima à superfície do meio, os frascos foram fechados com rolhas de borracha e foi injetado

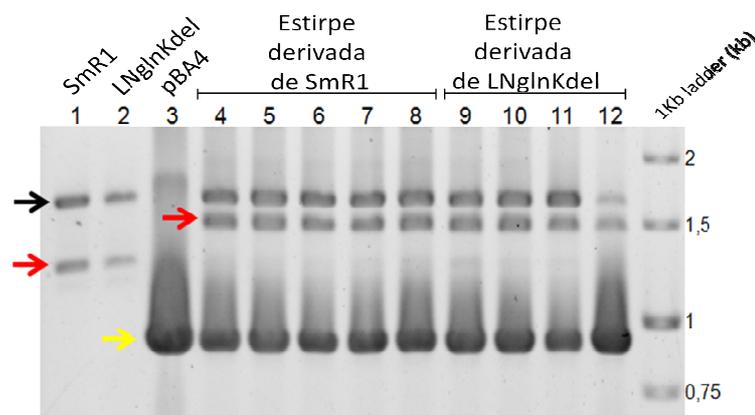
acetileno puro na concentração equivalente à 10% da fase gasosa. As culturas foram incubadas por mais 1 hora a 30°C e alíquotas de 0,5 mL da fase gasosa foram coletadas e analisadas por cromatografia gasosa (cromatógrafo Varian modelo 2440D equipado com coluna Porapak N e detector de ionização de chama; o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio super seco, fluxo de 20mL/min). A temperatura da coluna foi de 120°C e a do detector de 200°C. Como padrão foi utilizado etileno 100ppm (White Martins). A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos mutantes no gene *nifA* de *H. seropedicae*

O plasmídeo contendo o gene *nifA* deletado em 750pb da região central clonado no vetor pT7-7 (pBA4) foi transformado por eletroporação na estirpe SmR1 (selvagem) e LNglNkdel (mutante no gene *glnK*). As bactérias foram plaqueadas na presença de canamicina e as colônias transformantes resistentes ao antibiótico foram analisadas por amplificação do gene *nifA* a fim de confirmar o primeiro evento de recombinação. Neste passo é possível visualizar 2 cópias do gene *nifA*, uma selvagem de 1,6kb indicada por uma seta preta e uma mutante de 0,85kb indicada por uma seta amarela (FIGURA 7). As setas vermelhas indicam fragmento inespecífico. Nas linhas 1 e 2 da figura 7A estão os amplificados das estirpes SmR1 e LNglNkdel respectivamente, indicando o tamanho do gene selvagem. Na linha 3 está o gene amplificado do plasmídeo pBA4 indicando o tamanho do fragmento deletado. Nas linhas 4 a 8, desta mesma figura, estão os 2 genes (selvagem e deletado) amplificados das colônias que sofreram o primeiro evento de recombinação na estirpe SmR1 e nas linhas 9 a 12 ocorre o mesmo do anterior porém na estirpe LNglNkdel. Com a confirmação, essas estirpes foram plaqueadas em sacarose para selecionar as bactérias que sofreram o segundo evento de recombinação. Neste evento o cassete *sacB::Km* é expulso do genoma e leva consigo o gene *nifA* selvagem, deixando apenas a cópia deletada. Após esse evento mais uma PCR foi realizada para confirmar a ausência do gene *nifA* selvagem (FIGURA 7B). Na linha 1 da figura 7B está o amplificado a partir do plasmídeo pBA4 indicando o tamanho do gene deletado. Nas linhas 2 e 4, desta mesma figura, estão os amplificados do gene *nifA* selvagem das estirpes SmR1 e LNglNkdel respectivamente e nas linhas 3 e 5 estão os amplificados do gene deletado após o segundo evento de recombinação. Estes experimentos resultaram na estirpe NifAdel, que possui o gene *nifA* parcialmente deletado e o duplo-mutante NifAdel/GlnKdel que apresenta deleções nos genes *nifA* e *glnK* de *H. seropedicae*.

A



B

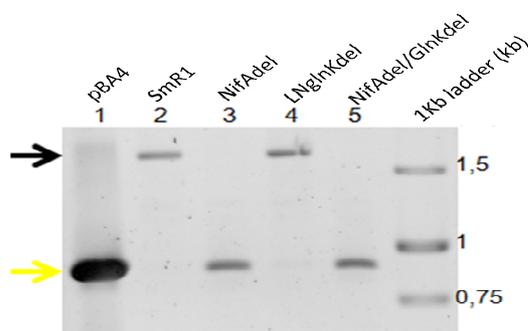


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do gene *nifA* nas estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A seta preta indica o amplificado do gene *nifA* selvagem, a seta amarela indica o gene *nifA* deletado. Painel A – Primeiro evento de recombinação, as linhas 1 e 2 mostram o amplificado da estirpe selvagem SmR1 e mutante LNginKdel, respectivamente. Linha 3 mostra o produto da amplificação do plasmídeo pBA4. Linhas 4 a 12 encontram-se os amplificados referente ao 1º evento de recombinação nas estirpes SmR1 e LNginKdel como indicado. As setas vermelhas indicam bandas inespecíficas. Painel B – Confirmação do segundo evento de recombinação na deleção do gene *nifA*. Linha 1 indica o produto de amplificação do plasmídeo pBA4; Linha 2 e 4 o gene *nifA* inteiro da estirpe SmR1 e LNginKdel; Linha 3 e 5 mostra a amplificação do gene *nifA* parcialmente deletado nas estirpes mutantes NifAdel e duplo mutante NifAdel/GlnKdel.

4.2 Atividade de Nitrogenase dos mutantes no gene *nifA*

Ensaio de nitrogenase foram realizados para verificar a capacidade dos mutantes em fixar nitrogênio. As células foram crescidas em meio NFbHP-malato semi-sólido, conforme descrito em material e métodos, e a atividade é indicada em nmol de etileno/mg de proteína. O mutante NifAdel e o duplo mutante NifAdel/GlnKdel não foram capazes de converter o acetileno a etileno. Experimentos de complementação foram realizados para confirmar a mutação no gene *nifA*. O

plasmídeo pRAMM1, que expressa a NifA inteira a partir do vetor pLAFR3.18, foi utilizado para complementar o mutante NifAdel. Já nos mutantes derivados de LN_{GlnKdel}, a NifA inteira não é ativa pela ausência de GlnK, sendo que neste caso foi utilizado o plasmídeo ppnifAN185, que codifica a uma proteína NifA com deleção de 185 aminoácidos da região N-terminal expressa a partir do promotor *nifA* clonado no vetor pLAFR 3.18. A estirpe SmR1 foi utilizada como controle experimental. Como mostra na figura 8, as estirpes mutantes LN_{GlnKdel}, NifAdel e NifAdel/GlnKdel não foram capazes de formar etileno, já quando foram complementadas com o gene *nifA* (inteiro ou N-truncado) a partir do pLAFR3.18, foi retomado parcialmente a capacidade em converter o acetileno a etileno indicando atividade de nitrogenase.

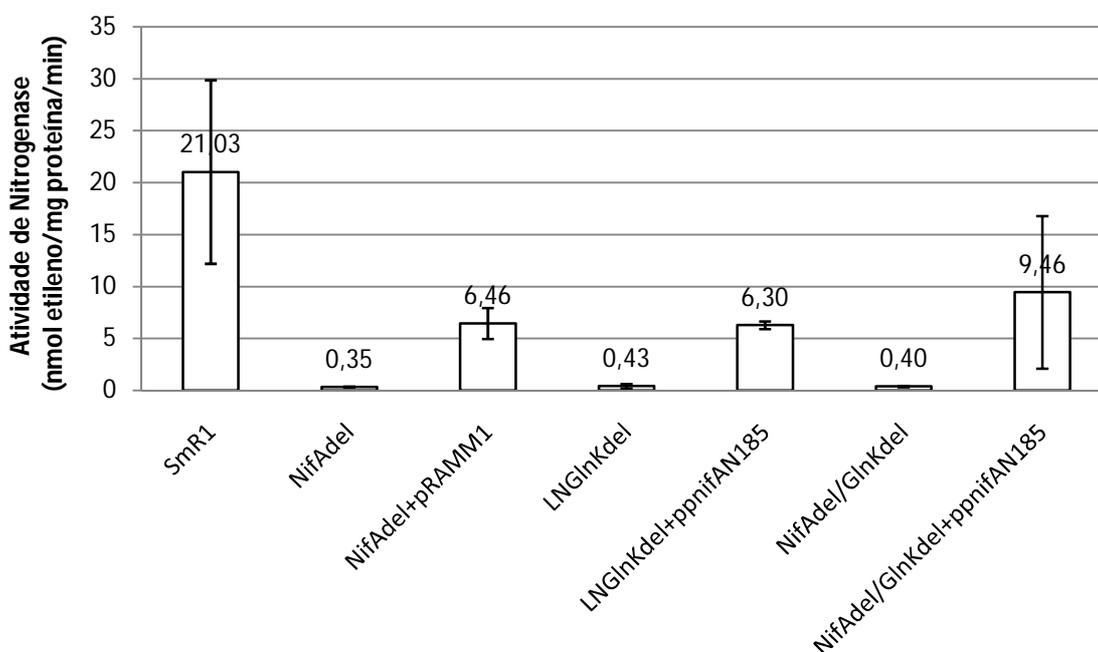


Figura 8: Atividade de nitrogenase das estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae*. A atividade foi determinada de acordo com descrito em material e métodos na presença ou não de plasmídeos expressando a proteína NifA inteira (pRAMM1) ou N-truncada (ppnifAN185). As barras indicam o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

4.3 Análise da capacidade de ativação da transcrição das proteínas NifA mutantes em *E. coli*

A caracterização das proteínas NifA mutantes foi iniciada com experimentos em *E. coli*. Os genes *nifA* mutagenizados clonados no vetor pET29a foram transformados na estirpe JM109(DE3) de *E. coli* contendo o plasmídeo pRT22

(*nifH(K. pneumoniae):lacZ*). A fim de determinar se as mutantes estavam sendo expressas, foi realizado um teste de expressão. A estirpe JM109(DE3) contendo o plasmídeo foi crescida em LB até uma DO_{600} de aproximadamente de 0,5 e induzida com 0,5 mmol/L IPTG por 3 horas a 30°C. Então essas culturas foram centrifugadas, sonicadas e aplicadas em um gel de poliácridamida, como mostra a figura 9.

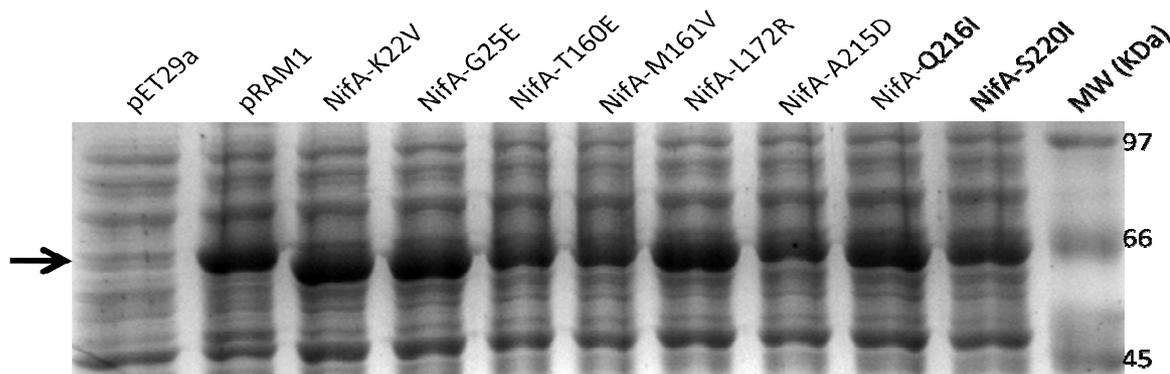


Figura 9: Expressão das proteínas NifA mutantes em *E. coli* estirpe JM109(DE3). As células contendo o plasmídeo foram crescidas em LB e a expressão das proteínas foi induzida com a adição de 0,5mmol/L de IPTG. Após centrifugadas e sonicadas, as amostras foram aplicadas em um gel de SDS-PAGE e corados com COOMASSIE-BLUE. A seta indica as proteínas NifA superexpressas. MW indica o padrão de massa molecular em KDa (GE-Healthcare).

Após a confirmação da correta expressão dessas proteínas, o experimento para avaliar a atividade das mesmas foi iniciado com um pré-inóculo em NFDM sem amônio. Após o crescimento, as culturas foram diluídas para uma DO_{600} de 0,1 e crescidas na presença de 20 mmol/L de NH_4Cl (condição N+) ou 0,02% de casaminoácidos (condição N-) e a expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG. Após incubar por 16 horas a 30°C em anaerobiose a atividade de β -galactosidase foi determinada. Foi utilizado a NifA selvagem (pRAM1) como controle negativo, uma vez que ela não tem atividade em *E. coli*. Como controle positivo foi utilizada a proteína NifA sem o domínio regulatório N-terminal (pRAM2). As proteínas mutantes K22V, T160E, M161V, L172R, A215D, Q216I e S220I apresentaram o mesmo fenótipo da proteína NifA selvagem em *E. coli* (FIGURA 10).

A proteína com a mutação G25E se mostrou ativa nesta estirpe tanto na presença quanto na ausência de amônio (FIGURA 10). Indicando que esta mutação pode ter alterado o padrão de interação com o domínio Central e assim comprometido a regulação pelos níveis de nitrogênio nesta proteína.

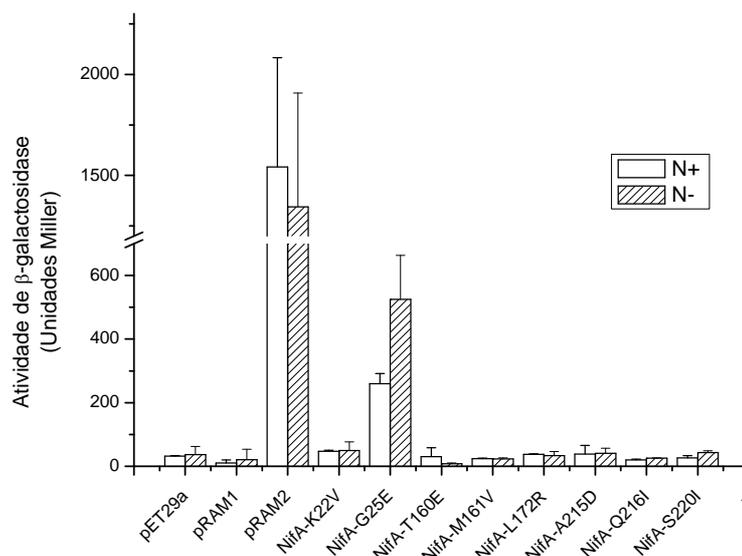


Figura 10: Atividade de β -galactosidase da proteína NifA inteira em *E. coli*. N+ indica presença de 20 mmol/L de cloreto de amônio e N- indica a presença de 0,02% de casaminoácidos, os experimentos foram realizados em anaerobiose. As barras de erro indicam o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Considerando que as mutações A215D, Q216I e S220I estão localizadas no domínio Central e que a proteína selvagem não apresenta atividade em *E. coli*, foi necessário deletar os 203 aminoácidos iniciais do domínio N-terminal nesses mutantes para verificar a influência dessas mutações na atividade desta proteína. Foi utilizado como controle positivo o plasmídeo pRAM2, que expressa uma NifA sem os primeiros 203 aminoácidos correspondentes ao domínio N-terminal. Essa proteína perde a regulação por nitrogênio, no entanto não apresenta atividade na presença de oxigênio. Os plasmídeos contendo as proteínas N-truncadas mutagenizadas, expressas a partir do vetor pET29a, foram transformados na estirpe de *E. coli* JM109 (DE3) contendo o plasmídeo pRT22 (*nifH(K. pneumoniae)::lacZ*). Essas culturas foram crescidas em NFDM utilizando casaminoácidos como fonte de nitrogênio suplementado com 5% de LB. O inóculo do experimento foi feito em uma DO_{600} inicial de 0,2 suplementado com 20 mmol/L de NH_4Cl (condição N+) ou com 0,02% de casaminoácidos (condição N-). Os frascos foram selados e a atmosfera trocada por nitrogênio (condição O-) ou crescidos na presença de oxigênio (condição O+). As culturas foram então incubadas sob agitação a 30°C por 8 horas. Como podemos observar na figura 12 a proteína N-truncada mostrou atividade tanto na

presença quanto na ausência de amônio como visto por Monteiro e colaboradores (1999a) e sofreu regulação negativa na presença de oxigênio. A falta de regulação por amônio e a regulação por oxigênio também foram observadas nas proteínas N-truncadas com as mutações Q216I e S220I, indicando que essas mutações não inativam a proteína, ou seja, não provocam uma alteração que comprometa completamente a atividade de transcrição desta proteína (FIGURA 11), além de não alterarem a regulação por oxigênio. Já a proteína N-truncada com a mutação A215D não apresentou atividade em nenhuma das condições testadas.

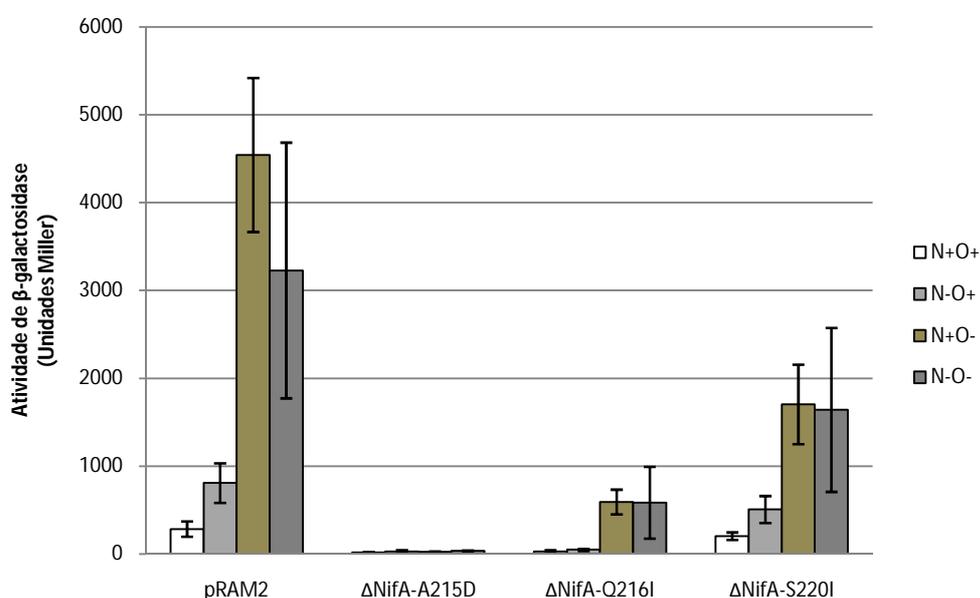


Figura 11: Atividade de β -galactosidase das proteínas NifAs N-truncadas. N+ indica presença de 20 mmol/L de cloreto de amônio e N- indica a presença de 0,02% de casaminoácidos. O+ indica que as culturas foram crescidas em aerobiose, já O- indica crescimento em anaerobiose. As barras de erro indicam o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

A falta de atividade da proteína N-truncada NifA-A215D pode ser devido a ausência de expressão desta proteína. A fim de determinar se essas proteínas estavam sendo expressas, foi utilizado eletroforese de poli-acrilamida SDS-PAGE com amostras das culturas utilizadas no experimento (FIGURA 12). É possível observar que nas culturas em que só havia o vetor pET29a sem nenhum gene clonado a proteína N-truncada não era expressa. Já nas culturas com os plasmídeos contendo os genes que codificam para a proteína N-truncada, mutagenizada ou não, estavam sendo expressas, indicada pela seta, em todas as condições testadas

(FIGURA 12). Indicando que a falta de atividade da proteína N-truncada NifA-A215D não era por falha na expressão da mesma.

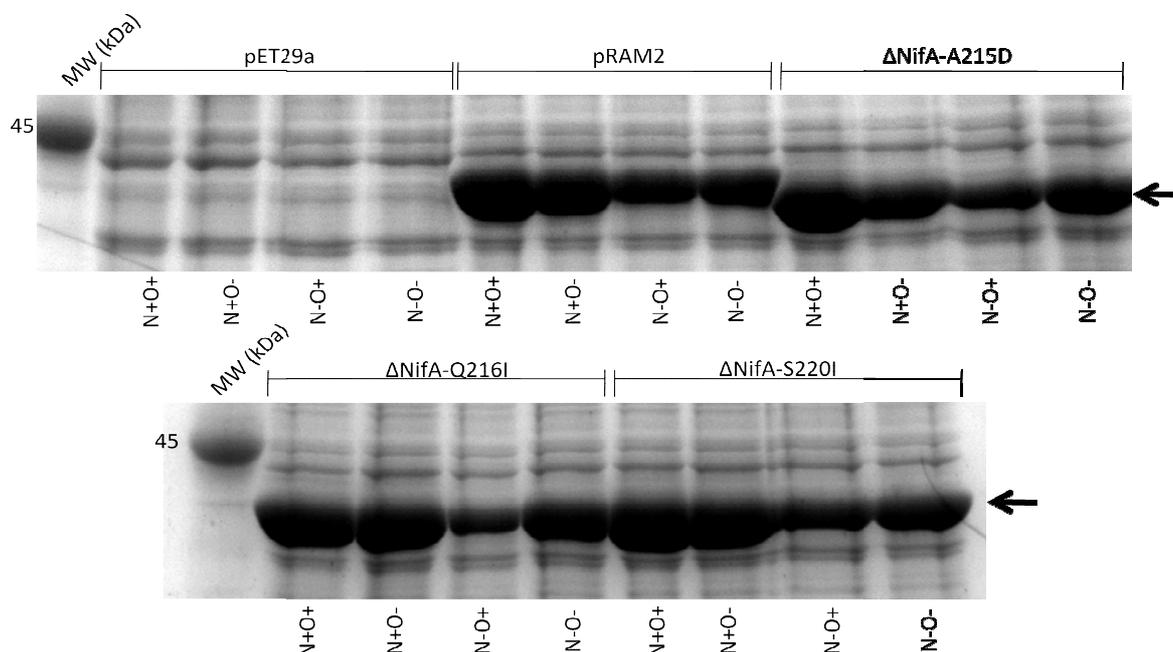


Figura 12: Expressão das proteínas NifA N-truncadas em *E. coli* estirpe JM109(DE3). As culturas do experimento de β -galactosidase foram centrifugadas, sonicadas e aplicadas em gel SDS-PAGE e corados com COOMASSIE-BLUE. Cada cultura foi crescida em quatro condições diferentes, N+ indica presença de 20 mmol/L de NH_4Cl , N- indica presença de 0,02% de casaminoácidos, O+ indica crescimento na presença de oxigênio e O- indica crescimento em ambiente anaeróbico. A seta indica as proteínas N-truncadas superexpressas. MW indica o padrão de massa molecular em kDa (GE-Healthcare).

4.4 Atividade de Nitrogenase dos mutantes no gene *nifA* complementados com NifA mutagenizada

Apesar da maioria das proteínas mutadas não mostrarem atividade em *E. coli*, estudos também foram realizados em *H. seropedicae* a fim de determinar a atividade destes mutantes. Estirpes mutantes no gene *nifA* e no gene *glnK* foram utilizadas para esse experimento. As células contendo o gene *nifA* mutado expresso a partir do vetor pLAFR3.18 foram crescidas em meio NFbHP-malato semi-sólido conforme descrito em material e métodos e a atividade é dada em nmol de etileno/mg de proteína. A estirpe SmR1 foi utilizada como controle positivo e como visto na tabela 4 as estirpes NifAdel (*nifA*-) e NifAdel/Glnkdel (*nifA*-/*glnK*-) não apresentam atividade de nitrogenase. A proteína NifA selvagem, expressa a partir do plasmídeo pRAMM1,

foi ativa apenas na presença de GlnK, semelhante ao visto com a mutação Q216I. Quando foram expressas as proteínas mutantes K22V, T160E, M161V, L172R, A215Q e S220I nas estirpes mutantes *nifA*-, não foi verificada atividade de nitrogenase. Já a mutação G25E originou uma proteína NifA capaz de ativar a transcrição dos genes *nif* mesmo na ausência de GlnK, como mostra a tabela 4.

Tabela 4: Complementação da atividade de nitrogenase nas estirpes mutantes de *H. seropedicae*.

Estirpes	Plasmídeo	Atividade de Nitrogenase (nmol etileno/mg proteína/min)
SmR1	-	11,1 ±2,7
	-	0,02 ±0,03
NifAdel	pRAMM1	4,0 ±1,3
	pLAFR-K22V	0
	pLAFR-G25E	19,7 ±6
	pLAFR-T160E	0
	pLAFR-M161V	0
	pLAFR-L172R	0,16 ±0,03
	pLAFR-A215D	0
	pLAFR-Q216I	2,8 ±0,3
	pLAFR-S220I	0,6 ±0,06
	NifAdel/GlnKdel	-
pRAMM1		0,03 ±0,07
pLAFR-K22V		0
pLAFR-G25E		11,8 ±2
pLAFR-T160E		0
pLAFR-M161V		0
pLAFR-L172R		0,02 ±0,05
pLAFR-A215D		0
pLAFR-Q216I		0
pLAFR-S220I		0

O desvio padrão é referente a 3 experimentos independentes.

4.5 Análise da atividade da proteína NifA-G25E em *H. seropedicae*

As estirpes mutantes no gene *nifA* foram utilizadas para a construção de estirpes com fusão cromossomal *nifH::lacZ*. Com essas novas estirpes foi possível determinar a atividade da NifA sem determinar a atividade da nitrogenase. Nestas estirpes a atividade de NifA, que é regulada negativamente pela presença de amônio e oxigênio, é determinada pela atividade de β -galactosidase.

A atividade da NifA selvagem e da mutante NifA-G25E foi determinada nas estirpes NifAdel::*lacZ* (*nifH::lacZ*) e na NifAdel/GlnKdel::*lacZ* (*nifH::lacZ*) expressos a

partir do vetor pLAFR3.18. As culturas foram crescidas em 5 mmol/L de glutamato e então diluídas para uma DO_{600} de 0,05 em condição de fixação (2 mmol/L de cloreto de amônio) ou condição de não fixação (20 mmol/L de cloreto de amônio). Essas culturas foram crescidas a 30°C durante 24 horas sob agitação e então 100 uL de célula foram coletados para determinar a atividade de β -galactosidase (FIGURA 13). A estirpe SmR1 com a fusão *nifH::lacZ* foi utilizada como controle e apresentou atividade de β -galactosidase apenas em baixa concentração de amônio. As estirpes NifAdel::*lacZ* e NifAdel/GlnKdel::*lacZ* não apresentaram atividade na ausência do plasmídeo. Quando essas estirpes foram conjugadas com o plasmídeo pRAMM1, expressando NifA selvagem a partir do vetor pLAFR3.18, mesmo na condição de fixação de nitrogênio não houve atividade. Isso provavelmente se deve ao fato de que este método pode não ser sensível o suficiente para detectar baixos níveis de atividade, uma vez que a expressão de NifA a partir deste vetor é baixa. No entanto quando utilizamos o vetor pLAFR3.18 contendo a NifA-G25E houve atividade mesmo na ausência de GlnK, este fenótipo também foi observado no experimento de nitrogenase. Além disso, foi observado uma diferença entre as atividades desta proteína nas diferentes concentrações de amônio, sugerindo que esta proteína ainda é parcialmente regulada por nitrogênio, no entanto por uma via alternativa independente de GlnK.

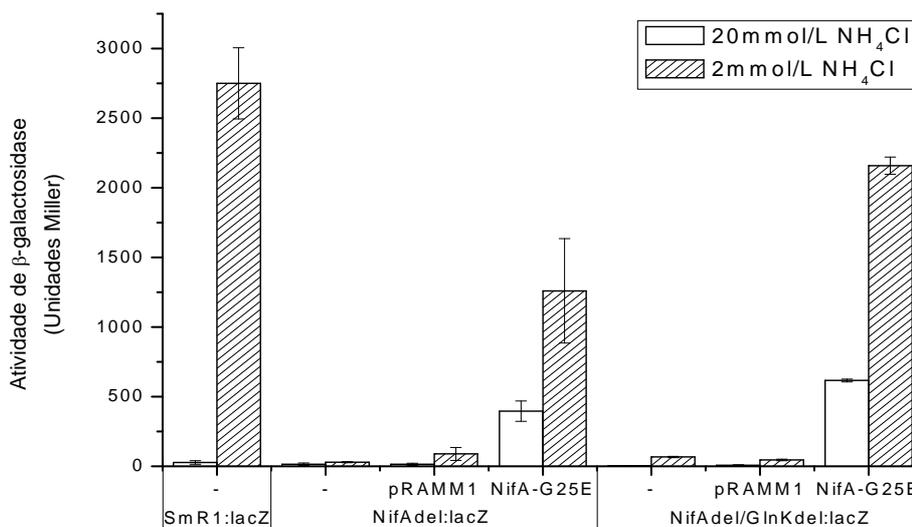


Figura 13: Atividade de β -galactosidase em *H. seropedicae* com fusão cromosomal *nifH:lacZ*. As estirpes foram crescidas por 24 horas na presença de 2 ou 20 mmol/L de amônio, contendo ou não os plasmídeos expressando NifA selvagem e mutante. As barras de erro representam o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

A fixação biológica de nitrogênio consiste na conversão do dinitrogênio à amônia. Essa reação é catalisada pelo complexo da nitrogenase e consome 16 moléculas de ATP por molécula de dinitrogênio reduzida (SIMPSON; BURRIS, 1984). Por ser uma reação com um alto consumo de energia, é necessário que seja altamente regulada. Essa regulação pode ser tanto a nível traducional quanto transcricional, sendo esta última realizada pela proteína NifA.

Os estudos da proteína NifA em *H. seropedicae* foram iniciados com o sequenciamento deste gene por Souza e colaboradores (1991a). Ainda, Monteiro e colaboradores (1999) verificaram que a proteína NifA deste organismo, sem o domínio N-terminal, apresentava atividade, no entanto perdia a regulação por nitrogênio. Esses resultados indicam que este domínio é responsável pela inativação desta proteína em altos níveis de nitrogênio fixado. Já a ativação desta proteína é dependente de proteínas da família PII (ARCONDEGUY; JACK; MERRICK, 2001) e em *H. seropedicae* verificaram que GlnK é responsável por essa ativação (NOINDORF et al, 2011)

Anteriormente a este trabalho, Etto (2006) construiu variantes do domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae* e verificou que as mutações no domínio N-terminal V138E e o duplo mutante (V138E/E134V) mantinham a atividade regulatória *in trans* sobre o domínio central, já as mutações L52Q e o tetra mutante (I96V/E134V/V138E/R157H) originaram um domínio N-terminal que era incapaz de regular a atividade da NifA. Além disso, a mutação Y18F, que em *A. brasilense* originou uma proteína NifA independente de GlnB, em *H. seropedicae* esse fenótipo não foi observado, sendo que neste organismo essa mutação gerou um domínio N-terminal que regula parcialmente a atividade da NifA (ETTO, 2006; COMARELLA, 2008). Ainda, Comarella (2008) verificou que a mutação I96V não alterou o fenótipo selvagem da NifA.

No presente trabalho foram construídos várias proteínas NifA com mutações pontuais. Alguns dos resíduos de aminoácidos foram selecionados por serem conservados em organismos onde o mecanismo de regulação da NifA independe de NifL e não eram conservados em organismos onde NifL está presente, com o objetivo de identificar a função destes resíduos de aminoácidos na atividade desta

proteína. Outros foram selecionados na literatura por apresentarem um fenótipo interessante.

No entanto para caracterizar a atividade destas proteínas NifA mutantes de *H. seropedicae* foi necessário inicialmente construir estirpes mutantes para esse gene. Foram utilizadas duas estirpes, a SmR1 (selvagem) (SOUZA et al., 1995) e a LN_{glnKdel} (NOINDORF et al., 2011). A estirpe LN_{glnKdel} possui o gene *glnK* deletado e é incapaz de fixar o nitrogênio (FIGURA 8; NOINDORF et al., 2011). Esta estirpe duplo mutante *nifA/glnK* é importante na caracterização de proteínas NifA que independa de GlnK para sua ativação.

Para tanto foi construído um plasmídeo com a deleção de um fragmento no domínio central do gene *nifA* (FIGURA 3), levando a expressão de uma proteína inativa. Após a recombinação homóloga dupla foi obtida a estirpe mutante no gene *nifA*, NifAdel, essa mutação foi comprovada inicialmente por PCR (FIGURA 7B) e em seguida pelo ensaio de nitrogenase (FIGURA 8). As estirpes mutantes não apresentaram atividade de nitrogenase. No entanto para nos certificarmos que essa incapacidade era devido a falta da atividade da proteína NifA, foi necessário complementá-las expressando a forma nativa, para a estirpe NifAdel, e uma forma N-truncada, para a estirpe NifAdel/GlnKdel, desta proteína e verificar o fenótipo.

A atividade da proteína NifA é regulada pelos níveis de nitrogênio e oxigênio. Há dois mecanismos de regulação desta proteína, o primeiro ocorre em organismos onde NifL, um anti-ativador, está presente, como por exemplo *K. pneumoniae*, *A. vinelandii*, *Azoarcus* spp (EGENER et al., 2002; BALI et al., 1992; COLLINS; BRILL, 1985). Na presença de nitrogênio fixado ou oxigênio, a proteína NifL interage com NifA inativando-a (MARTINEZ-ARGUDO; LITTLE; DIXON, 2004). O segundo mecanismo é observado em organismos onde NifL não está presente e a NifA sofre auto-regulação, como por exemplo em *H. seropedicae*, *A. brasilense*, *S. meliloti*, *B. japonicum* (SOUZA et al., 1991a; ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996; FISCHER; BRUDERER; HENNECKE, 1988; BEYNON; WILLIAMS; CANNON, 1988). Estudos mostraram que no segundo mecanismo, a regulação por oxigênio está relacionada com um motivo de quatro cisteínas localizados na porção C-terminal do domínio central e no interdomínio entre central e C-terminal (LID). Mutações pontuais dessas cisteínas por serinas causam uma perda de atividade na proteína NifA de *H. seropedicae* e *B. japonicum* no entanto, não afetam a

capacidade de ligação ao DNA (OLIVEIRA et al., 2009; FISCHER; BRUDERER; HENNECKE, 1988). Em *S. meliloti*, Krey e colaboradores (1992) obtiveram uma proteína mutante pontual no aminoácido 217, trocando a metionina por uma isoleucina, que mantinha sua atividade mesmo em altas concentrações de oxigênio. Tendo em vista essa mutação em *S. meliloti* e após o alinhamento com a NifA de *H. seropedicae* verificou-se que o aminoácido correspondente na NifA de *H. seropedicae* era a serina na posição 220. Foi então mutagenizado essa serina por uma isoleucina e o fenótipo desta proteína mutante foi caracterizado. Em *E. coli*, a NifA de *H. seropedicae* apesar de ser expressa, não é ativa, o mesmo ocorreu com a proteína NifA-S220I. Também foi testada a atividade desta proteína mutante em *H. seropedicae*, no entanto ela não apresentou atividade. Como essa mutação estava localizada no domínio central, nós construímos uma proteína N-truncada (sem o domínio N-terminal) com a mutação S220I e testamos sua atividade em *E. coli*. Neste caso a proteína se mostrou ativa, indicando que essa mutação não alterou drasticamente a estrutura terciária da proteína, porém ainda mantinha a regulação na presença de oxigênio. Apesar da mutação M217I na proteína NifA de *S. meliloti* causar uma resistência ao oxigênio, esse fenótipo não ocorreu na proteína NifA de *H. seropedicae*.

A regulação pelos níveis de nitrogênio em organismos onde NifL está presente é bem compreendida. Em *A. vinelandii* a interação do efector 2-oxoglutarato com o domínio N-terminal da proteína NifA impede a formação do complexo proteína-proteína com NifL, deixando NifA ativa (LITTLE et al., 2000). A inativação da NifA ocorre quando há a formação do complexo ternário NifL-NifA e a forma não modificada da proteína GlnK; quando GlnK está uridililada ela não é capaz de interagir com NifA (LITTLE et al., 2002). Em *K. pneumoniae* o mecanismo é diferente, na presença de GlnK, uridililada ou não, há a prevenção da formação do complexo NifL-NifA. Isso se dá porque a expressão de GlnK é ativada por NtrC apenas em condição de fixação, ou seja, só haverá GlnK quando houver necessidade de fixar nitrogênio (STIPS et al., 2004).

Em organismos onde NifL não está presente o domínio N-terminal regula a atividade da proteína NifA na presença de amônio (BEYNON; WILLIAMS; CANNON, 1988; MONTEIRO et al., 1999b). Estudos mostraram que proteínas do tipo PII também são importantes nesta regulação. Pawlowski e colaboradores (2003),

utilizando experimentos de duplo-híbrido em levedura, verificaram que em *Rhodobacter capsulatus* ambas as proteínas PII (GlnB e GlnK) foram capazes de interagir com as duas proteínas NifA1 e NifA2. Em *R. rubrum* a proteína PII responsável por ativar a NifA é a GlnB, uma vez que no mutante neste gene a expressão dos genes *nif* foi extinguida (ZHANG et al., 2000). GlnB também é responsável por ativar NifA em *A. brasilense* (ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996).

Utilizando o alinhamento de várias NifAs nós identificamos possíveis aminoácidos que são conservados podendo ser alvos de interação com PII. Após selecionarmos esses aminoácidos no domínio N-terminal (TABELA 2), nós testamos a atividade dessas proteínas mutantes. Apesar de estarem sendo expressas as proteínas com as mutações K22V, T160E, M161V e L172R não foram capazes de ativar a transcrição dos genes *nif* em nenhuma das condições testadas.

As mutações M161V e L172R correspondem as mutações M173V e L184R na NifA de *R. rubrum*. Neste organismo a primeira mutação gerou uma NifA que era capaz de interagir melhor com a GlnB, já a segunda mutação gerou uma NifA independente desta mesma PII (ZOU et al, 2008). Em *H. seropedicae* essas duas mutações causaram uma perda de atividade na proteína NifA. Isso provavelmente ocorreu porque essas mutações podem ter alterado a estrutura terciária da proteína impedindo seu enovelamento correto. No entanto não podemos descartar a possibilidade desses aminoácidos estarem em regiões importantes para a atividade desta proteína. Mas para comprovar a real influência dessa mudança mais experimentos de análise de conformação e interação entre proteínas necessitam ser feitos.

As mutações A215D e Q216I estavam localizadas no início do domínio central. Este domínio é caracterizado pela presença de estruturas de ligação a ATP (Walker A e B) e duas alças de interação com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase (GAFGA e ESELF) (FIGURA 1). Apesar de NifA não ter sua estrutura determinada, é improvável que esses aminoácidos estejam envolvidos em interações com essas estruturas, portanto não podemos justificar a falta de atividade pela perda de funcionabilidade das mesmas.

A fim de caracterizar essas NifAs (A215D e Q216I) nós inicialmente testamos se a proteína inteira era ativa em *E. coli*. Verificamos que como a NifA selvagem, as

mutantes não eram ativas. No entanto a forma N-truncada da NifA selvagem é ativa em *E. coli*, sendo assim, também construímos formas N-truncadas das NifAs mutantes e testamos sua atividade. A proteína Δ NifA-A215D, apesar de estar sendo expressa, não estava ativa, indicando uma falha na conformação desta proteína. Já a Δ NifA-Q216I mostrou atividade e regulação igual a proteína N-truncada selvagem. Do mesmo modo, ensaio de nitrogenase utilizando a proteína NifA-Q216I mostrou que essa mutação não comprometia completamente a atividade da proteína NifA e além disso, sua atividade ainda era dependente de GlnK, comprovada utilizando a estirpe NifAdel/GlnKdel (TABELA 4). Com isso nós podemos inferir que a mutação Q216I não afetou significativamente a regulação, no entanto a atividade diminuiu.

A mutação G25E originou uma NifA ativa em *E. coli*. Essa mesma mutação em *R. rubrum* gerou uma NifA ativa no mutante GlnB, sendo assim, também foi analisado se essa proteína era capaz de ativar a transcrição dos genes *nif* independente de PII. Ensaio de nitrogenase mostraram esta proteína foi ativa independente de GlnK sugerindo que essa mutação pode ter comprometido a interação entre o domínio N-terminal e o domínio Central, ou então essa mutação pode estar mimetizando uma interação com GlnK e assim ativando NifA.

Ainda, as estirpes com fusão cromossomal *nifH:lacZ* de *H. seropedicae* foram utilizadas para verificar a atividade desta proteína na presença de amônio. Foi observado que mesmo na presença de 20mmol/L de amônio a proteína NifA-G25E mantinha-se ativa, no entanto com uma regulação parcial pelos níveis de nitrogênio. Essa regulação é independente de GlnK, uma vez que, no duplo mutante NifAdel/GlnKdel, havia uma diferença na atividade entre baixo e alto níveis de amônio. O motivo desta regulação ainda não foi compreendido, no entanto é possível que outros fatores estejam influenciando a interação entre N-terminal e Central, como por exemplo, efetores como o 2-OG. Em *A. vinelandii* a ligação de 2-OG no domínio GAF da NifA previne a formação do complexo NifL-NifA, e quando este domínio é removido mesmo na presença de 2-OG, NifL é capaz de inibir NifA (LITTLE; DIXON, 2003). Apesar de não se ter informações de interação com o domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae*, acreditamos que esse efetor possa sinalizar um déficit de nitrogênio na célula para a NifA e assim ativá-la.

Levando em consideração que em *H. seropedicae*, a proteína GlnB em altas concentrações é capaz de substituir GlnK na regulação por nitrogênio, outra

hipótese seria que a mutação G25E estabilizaria a ligação da proteína GlnB com a NifA e assim regularia parcialmente sua atividade no mutante GlnK.

O mecanismo de regulação da NifA é bastante complexo e em *H. seropedicae* este mecanismo ainda não foi elucidado. Neste trabalho nós estudamos o papel de alguns aminoácidos na atividade de NifA através de mutações sítio dirigidas. Apesar da maioria das mutações extinguirem a atividade da proteína, a mutação G25E sugere que existem outros mecanismos de regulação da NifA independente de GlnK. Portanto mais estudos utilizando a proteína NifA-G25E poderão ser realizados a fim de se determinar o papel de outras moléculas na regulação por nitrogênio além de GlnK.

6 CONCLUSÕES

- As estirpes NifAdel e GlnKdel/NifAdel foram construídas;
- Foram construídas estirpes com fusão cromosomal *nifH:lacZ* (SmR1:lacZ; NifAdel:lacZ e NifAdel/GlnKdel:lacZ)
- As mutações K22V, T160E, M161V, L172R e A215D originaram variantes NifA inativas;
- A proteína com a mutação S220I foi ativa em *E. coli* apenas quando o domínio N-terminal foi removido e permaneceu sensível ao oxigênio;
- A proteína Q216I foi ativa e dependente de GlnK;
- A mutação G25E originou uma proteína NifA ativa e independente de GlnK, no entanto ainda sofria regulação parcial pelos níveis de nitrogênio.

7 REFERÊNCIAS

- AGRON, P. G.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D. R. Oxygen regulation on *nifA* transcription *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 3506-3510, 1993.
- ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J.Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1563-1589, 2000.
- ARAÚJO, M.S.; BAURA, V.A.; SOUZA, E.M.; BENELLI, E.M.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. In vitro uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Protein Express. Purif.**, v. 33, p. 19-24, 2004.
- ARCONDEGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA Activity by PII in *Azospirillum brasilense*: Evidence by a Regulatory Role of the NifA N-terminal Domain. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4830-4838, 1996.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P.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 Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 339-343, 1999.
- ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. Role of GlnK transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 184, p. 5364-5375, 1998.
- ATKINSON, M.R.; BLAUWKAMP, T.A.; NINFA, A.J. Context-dependent functions of the PII and the GlnK signal transduction proteins in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5364-5375, 2002.
- AUSTIN, S.; BUCK, M.; CANNON, W.; EYDMANN, T.; DIXON, R. Purification and In Vitro Activities of the Nitrogen Fixation Control Proteins NifA and NifL. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 3460-3465, 1994.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 802-810, 1996.
- BALI, A.; BLANCO, G.; HILL, S.; KENNEDY, C. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. **Appl. Environ. Microbiol.**, 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*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.
- BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. The isolated catalytic domain of NIFA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription *in vitro*: Activation is inhibited by NIFL. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 103-107, 1994.
- BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; LEE, H.; KUSTU, S. In Vitro Studies of the Domains of the Nitrogen Fixation Regulatory NifA Protein. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 191-199, 1995.

- BEYNON, J.L.; WILLIAMS, M.K.; CANNON, C.F. Expression and functional analysis of the *Rhizobium meliloti nifA* gene. **EMBO J.**, v. 7, p. 7-14, 1988.
- BONATTO, A.C.; COUTO, G.H.; SOUZA, E.M.; ARAÚJO, L.M.; PEDROSA, F.O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E.M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expr. Purif.**, v. 55, p. 293-299, 2007.
- BUCK, M.; GALLEGOS, M.; STUDHOLME, D.J.; GUO, Y.; GRALLA, J.D. The Bacterial Enhancer-Dependent σ^{54} (σ^N) Transcription Factor. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 4129-4136, 2000.
- BULEN, W.A.; LECOMTE, J.R. The Nitrogenase System from *Azotobacter*: Two-Enzyme Requirement for N_2 Reduction, ATP-Dependent H_2 Evolution, and ATP Hydrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 56, p. 979-986, 1966.
- 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.
- CARR, P.D.; CHEAH, E.; SUFFOLK, P.M.; VASUDEVAN, S.G.; DIXON, N.E.; OLLIS, D.L. X-ray structure of the signal transduction protein PII from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.**, v. 52, p. 93-104, 1996.
- CHEAH, E.; CARR, P.D.; SUFFOLK, P.M.; VASUDEVAN, S.G.; DIXON, N.E.; OLLIS, D.L. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure**, v. 2, p. 981-990, 1994.
- CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, J. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr→Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol. Gen. Genomics**, v. 273, p. 415-422, 2005.
- CHUNG, C.T.; NIEMELA, S.L.; MILLER, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli* transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2172-2175, 1989.
- COLLINS, J.; BRILL, W.J. Control of *Klebsiella pneumoniae nif* mRNA synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 162, p. 1186-1190, 1985.
- CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, A.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67. p. 2375 – 2379, 2001.
- DAGO, A.E.; WIGNESHWERARAJ, S.R.; BUCK, M.; MORETT, E. A role for the conserved GAFTGA motif of AAA+ transcription activators in sensing promoter DNA conformation. **J. Biol. Chem.** v. 282, p. 1087-1097, 2007.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 127, p. 285-294, 1966.
- DIXON, R. The oxygen-responsive NifL-NifA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-Proteobacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 169, p. 371-380, 1998.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.
- DREPPER, T.; GROSS, S.; YAKUNIN, A.F.; HALLENBECK, P.C.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiol.**, v. 149, p. 2203-2212, 2003.

EADY, R. R. Structure-Function Relationships of Alternative Nitrogenases. **Chem. Rev.** v. 96, p. 3013-3030, 1996.

EGENER, T.; SARKAR, A.; MARTIN, D.E.; REINHOLD-HUREK, B. Identification of a NifL-like protein in a diazotroph of the beta-subgroup of the Proteobacteria, *Azoarcus* sp. strain BH72. **Microbiol.**, v. 148, p. 3203-3212, 2002.

FISCHER, H.; 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 Res.**, v. 16, p. 2207-2224, 1988.

FISCHER, H.; FRITSCHKE, S.; HERZOG, B.; HENNECKE, H. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein. **FEBS Lett.**, v. 225, p. 167-171, 1989.

GRABBE, R.; KLOPPROGGE, K.; SCHMITZ, R.A. Fnr Is Required for NifL-Dependent Oxygen Control of *nif* Gene Expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 1385-1393, 2001.

GRABBE, R.; SCHMITZ, R.A. Oxygen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* depends of NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 1555-1566, 2003.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytol.**, v. 154, p. 131-145, 2002.

HAGEMAN, R.V.; BURRIS, R.H. Electron Allocation to Alternative Substrates of Azotobacter Nitrogenase is Controlled by the Electron Flux Through Dinitrogenase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 591, p. 63-75, 1980.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological Role for the GlnK Protein of Enteric Bacteria: Relief of NifL Inhibition under Nitrogen-Limiting conditions. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6661-6667, 1998.

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

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

HOWARD, J.B.; REES, D.C. How Many Metals Does it Take to Fix N₂? A Mechanistic Overview of Biological Nitrogen Fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 46, p. 17088-17093, 2006.

HUALA, E.; AUSUBEL, F.M.; The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. **J. Bacteriol.** v. 171, p. 3354-3365, 1989.

HUBNER, P.; WILLISON, J.C.; VIGNAIS, P.M.; BICKLE, T.A. Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** v. 173, p. 2993-2999, 1991.

HYNES, M.F.; QUANDT, J.; O'CONNELL, M.P.; PUHLER, A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. **Gene**, v. 78, p. 111-120, 1989.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and Colonization of Rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 15, p. 894-906, 2002.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; NINFA, A.J. Probing interactions of the homotrimeric PII signaltransduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits. **J. Bacteriol.** v. 179, p. 4354-4360, 1997.

KAMBEROV, E.S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A.J. The *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Is Activated upon Binding 2-Ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 17797-17807, 1995.

KIM, J.; WOO, D.; REES, D.C. X-ray Crystal Structure of the Nitrogenase Molybdenum-Iron Protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å Resolution. **Biochem.** v. 32, p. 7104-7115, 1993.

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

KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; SCHMITZ, R.A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.**, v. 177, p. 223-234, 2002.

KOKOTEK, W.; LOTZ, W. Construction of a *lacZ*-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. **Gene**, v. 84, p. 467-471, 1989.

KOOPMAN, M.M.; FUSELIER, D.M.; HIRD, S.; CARSTENS, B.C. The carnivorous pale pitcher plant harbors diverse, distinct, and time-dependent bacterial communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 1851-1860, 2010.

KREY, R.; PUHLER, A.; KLIPP, W. A defined amino acid exchange close to the putative nucleotide binding site is responsible for an oxygen-tolerant variant of the *Rhizobium meliloti* NifA protein. **Mol. Gen. Genet.**, v. 234, p. 433-441, 1992.

LANCASTER, K.M.; ROEMELT, M.; ETTENHUBER, P.; HU, Y.; RIBBE, M.W.; NEESE, F.; BERGMANN, U.; DEBEER, S. X-ray Emission Spectroscopy Evidence a Central Carbon in the Nitrogenase Iron-Molybdenum Cofactor. **Science**, v. 334, p. 974-977, 2011.

LEI, S.; LAKSHMIDEVI, P.; GAVINI, N. Genetic analysis of *nif* regulatory genes by utilizing the yeast two-hybrid system detected formation of a NifL-NifA complex that is implicated in regulated expression of *nif* genes. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 6535-6539, 1999.

LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, Y.; ZHANG, W.C.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory system. **EMBO J**, v. 19, p. 6041-6050, 2000.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct Interaction of the NifL Regulatory Protein with the GlnK Signal Transduction Enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA Regulatory System to Respond to Conditions Replete for Nitrogen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 15472-15481, 2002.

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. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 28711-28718, 2003.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p. 1731-1744, 2004.

MARTINEZ, M.; COLOMBO, M.V.; PALACIOS, J.M.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGUESO, T. Novel arrangement of enhancer sequences for NifA-dependent activation of the hydrogenase gene promoter in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 3185-3191, 2008.

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

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

MINCHIN, S.D.; AUSTIN, S.; DIXON, R.A. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae nifLA* promoter by NTRC is face-of-the-helix dependent and the activator stabilizes the interaction of sigma 54-RNA polymerase with the promoter. **EMBO J.**, v. 8, p. 3491-3499, 1989.

MONEY, T.; JONES, T.; DIXON, R.; AUSTIN, S. Isolation and Properties of the Complex between the Enhancer Binding Protein NIFA and the Sensor NIFL. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 4461-4468, 1999.

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 Lett.**, v. 447, p. 283-286, 1999a.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. In-trans regulation of the N-truncated-NIFA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, Rose Adele. **Análise funcional dos domínios modulares da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae*.** Curitiba, 2001. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; WASSEM, R.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 508, p. 1-4, 2001.

MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Expression, purification and functional analysis of the C-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Expr. Purif.** v. 27, p. 313-318, 2003.

MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 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 sequence of the *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic Acids Res.**, v. 16, p. 11469-1488, 1988.

MORETT, E.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H. Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 3478-3487, 1991.

NEES, D.W., STEIN, P.A., LUDWIG, R.A. The *Azorhizobium caulinodans nifA* gene: identification of upstream-activating sequences including a new element, the “anaerobox”. **Nucleic Acids Res.**, v. 10, p. 9839-9853, 1988.

NIENABER, A.; HUBER, A.; GOTTFERT, M.; HENNECKE, H.; FISCHER, H.M. Three new NifA-regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA hybridization. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 1472-1480, 2000.

NOINDORF, L. **Identificação e caracterização do operon *orf1glnKamtB* e do gene *amtH* de *Herbaspirillum seropedicae*.** Curitiba, 2006. Tese (doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOINDORF, L.; REGO, F.G.M.; BAURA, V.A.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; RIGU, L.U.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, p. 55-62, 2006.

NOINDORF, L.; BONATTO, A.C.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; RIGU, L.U.; PEDROSA, F.O.; STEFFENS, M.B.R.; CHUBATSU, L.S. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC Microbiol.**, v. 11, n. 8, 2011.

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. **Res. Microbiol.**, v. 160, p. 389-395, 2009.

OLIVEIRA, M.A.S.; AQUINO, B.; BONATTO, A.C.; HUERGO, L.F.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R.A. Interaction of GlnK with the GAF domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA mediates NH₄⁺-regulation. **Biochimie**, v., p., 2012.

OLIVEIRA, Marco Aurelio Schüler. **Efeito da mutação das cisteínas nas posições 414, 426, 446 e 451 da proteína NifA de *H. seropedicae***. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PASCHEN, A.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating *nif* genes expression in the presence of ammonium. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 200, p. 207-213, 2001.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GROSS, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yeast Two-Hybrid Studies on Interaction of Proteins Involved in Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 5240-5247, 2003.

PHILIP, P.; BATUT, J.; BOISTARD, P. *Rhizobium meliloti* FixL is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti nifA* e *fixK* genes differently in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 4255-4262, 1990.

RAY, P.; SMITH, K.J.; PARSLAW, R.A.; DIXON, R.; HYDE, E.I. Secondary structure and DNA binding by the C-terminal domain of the transcriptional activator NifA from *Klebsiella pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 3972-3980, 2002.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R.E. The Natural History of Nitrogen Fixation. **Mol. Biol. Evol.** v. 21, p. 541-554, 2004.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Mutant form of the *Azotobacter vinelandii* transcriptional activator NifA resistant to inhibition by the NifL regulatory protein. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 6777-6785, 2002.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGU, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, v.35, p.261-270, 2003.

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

SCHMITZ, R.A.; HE, L.; KUSTU, S. Iron is required to relieve inhibitory effects on NifL on transcriptional activation by NifA in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4679-4687, 1996.

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

SCREEN, S.; WATSON, J.; DIXON, R. Oxygen sensitivity and metal ion-dependent transcriptional activation by NifA protein from *Rhizobium leguminosarum* bivar *trifolii*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 245, p. 313-322, 1994.

SIMON, R.; PRIEFFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **BioTechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

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

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

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

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

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. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promotes element. **Microbiol.**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

SPATZAL, T.; AKSOYOGLU, M.; ZHANG, L.; ANDRADE, S.L.A.; SCHLEICHER, E.; WEBER, S.; REES, D.C.; EINSLE, O. Evidence for Interstitial Carbon in Nitrogenase FeMo Cofactor. **Science**, v. 334, p. 940, 2011.

SPILKER, T.; ULUER, A.Z.; MARTY, F.M.; YEH, W.W.; LEVISON, J.H.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. Recovery of *Herbaspirillum* species from persons with cystic fibrosis. **J. Clinical Microbiol.**, v. 46, p. 2774-2777, 2008.

STIPS, J.; THUMMER, R.; NEUMANN, M.; SCHMITZ, R.A. GlnK effects complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 3379-3388, 2004.

TRUAN, D.; HUERGO, L.F.; CHUBATSU, L.S.; MERRICK, M.; LI, X.D.; WINKLER, F.K. A new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. **J. Mol. Biol.**, v. 400, p. 531-539, 2010.

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

WASSEM, R.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; REGO, F.G.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, p. 177-182, 2002.

WOOTTON, J.C.; DRUMMOND, M. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory protein. **Protein Eng.**, v. 2, p. 535-543, 1989.

XIE, Z.; DOU, Y.; PING, S.; CHEN, M.; WANG, G.; ELMERICH, C.; LIN, M. Interaction between NifL and NifA in the nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Microbiol.**, v. 152, p. 3535-3542, 2006.

XU, Y.; CARR, P. D.; HUBER, T.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. The structure of the PII-ATP complex. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2028-1037, 2001.

ZHANG, Y.; POLHMANN, E.L.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 983-992, 2000.

ZHANG, Y.; POLHMANN, E.L.; ROBERTS, G.P. Identification of a critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 2782-2787, 2004.

ZOU, X.; ZHU, Y.; POHLMANN, E.L.; LI, J.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G.P. Identification and function characterization of NifA variants that are independent of GlnB activation in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiol.**, v. 154, p. 2689-2699, 2008.