

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATHEUS FELIPE PASSOS



CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDEO PARA A EXPRESSÃO
DA PROTEÍNA MUTANTE PONTUAL GlnK P10L DE
Herbaspirillum seropedicae

CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATHEUS FELIPE PASSOS

CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDEO PARA A EXPRESSÃO
DA PROTEÍNA MUTANTE PONTUAL GlnK P10L DE
Herbaspirillum seropedicae

Monografia apresentada ao curso de Ciências
Biológicas como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rose Adele Monteiro
Co-orientadores: Dr^o Marco Aurélio Schüller
M^e Adriano Stefanello

CURITIBA

2015

MATHEUS FELIPE PASSOS

CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDEO PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MUTANTE PONTUAL GlnK P10L
DE *Herbaspirillum seropedicae*

Monografia aprovada como quesito para a aprovação na disciplina Estágio Supervisionado em
Biologia – BIO028 do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof^a Dr^a Rose Adele Monteiro

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Dr. Marcelo Bueno Batista

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 1 de Julho de 2015

“Um ninja é aquele que persiste, permanece firme... Deixe-me te ensinar uma coisa... o atributo mais importante de um ninja. Não é o número de técnicas que ele domina. O mais importante é a coragem de nunca desistir.”

Jiraya, personagem de Masashi Kishimoto

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Rose Adele Monteiro pela oportunidade e pelas valiosas orientações, também Adriano e ao Marco Aurélio pela coorientação e por não desistirem de me colocar no caminho certo na busca pelos resultados.

Ao CNPq pela bolsa.

Ao Estevan, pela amizade, pelas dicas e por abrir mão de muitos finais de semana para me ajudar e sem quem eu não teria conseguido a tempo.

A todos os alunos da biologia molecular da Bioquímica especialmente Edileuza, Marcelo, Anelis, Thalita, Denny, Robson, Tuca, Marina, Edson, Tayná e Alex pela paciência e pelos muitos ensinamentos que me passaram e aos meus colegas de graduação e iniciação científica Joyce, Duff, Renato, Max, Bruno, Jaque, Fernanda, Lucas, Mari, Andrey e muitos outros.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

À Professora Vanessa Kava por fomentar em mim o apego a ciências, também os Professores Emanuel Maltempi de Souza, Marcelo Santos, Erika Amano, Ana Claudia Bonatto, Thelma Ludwig, Joana Silveira, Margarete Cestari, Vânia Cabral e todos que ajudam a construir o ensino de primeira qualidade da Universidade.

À secretária de Ciências Biológicas, Rosane Martins por todo o empenho que tem pela Universidade e seus estudantes e aos técnicos do departamento, Dona Roseli Prado, Lucinéia e Valter.

Aos meus amigos Noob, Tays, Rose, Ganz, Wesley, Gabriel, Jiéssica, Érika, Eduardo, Diego, Samy e Theff pela amizade e todas as implicações que este tipo de amor acarreta.

Ao Alan, que nos momentos mais difíceis me dera forças para me reerguer.

À minha avó, Eunice, por tantos motivos que seria impossível agradecer em uma monografia inteira, ao meu pai, Gilberto, meus irmãos Tainá, Bruna, Júlia, Ricardo, Walker e Samuel. Também a Fabiana, Julcemar, Noêmia, Nathália, Sandra, Lúcia, Regina, meu primo e parceiro Guilherme e toda a minha imensa família que sempre me deu apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	v
RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	01
1.2 Fixação Biológica de Nitrogênio	01
1.3 Proteína NifA	02
1.4 Proteína GlnK	04
2. OBJETIVOS	06
3. MATERIAIS E MÉTODOS	06
3.1 Reagentes	06
3.2 Bactérias e Plasmídeos	06
3.3 Meios de Cultura e Condições de Cultivo	07
3.4 Antibióticos	08
3.5 Análise Eletroforética do DNA	08
3.6 Extração de DNA plasmidial	08
3.7 Reações de Restrição	09
3.8 Reações de Ligação	09
3.9 Preparo de Célula Eletrocompetente	10
3.10 Preparo de Célula Quimiocompetente	10
3.11 Dosagem de Proteínas	11
3.12 Teste de Expressão	11
3.13 Eletroforese De Proteínas Sob Condições Desnaturantes (SDS – PAGE)	12
4. RESULTADOS	13
4.1 Clonagem do gene mutante glnK no vetor pET29a	13
4.2 Expressão da proteína GlnKP10L	15
5. REFERÊNCIAS	17

LISTA DE ABREVIÇÕES

2-OG	2-oxoglutarato
AAA+	ATPases associadas a várias atividades celulares
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
Ap ^R	Resistência a ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra ético
FBN	Fixação biológica do nitrogênio
IPTG	Isopropiltiogalactopiranosídeo
Km ^R	Resistência a kanamicina
MCSII	Sítio de policlonagem II (do vetor pETDuet1)
PA	Persulfato de amônio
pb	pares de bases
Rpm	Rotações por minuto
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UAS sequence)	Sequência ativadora à jusante (do inglês, upstream activation sequence)
UMP	Uridina monofosfato

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma β -proteobacteria, promotora de crescimento vegetal, encontrada em gramíneas como arroz, milho e sorgo além de outras plantas de interesse econômico. Estudos apontam ganhos de até 50% do peso seco em plantas inoculadas com a espécie. *H. seropedicae* é capaz de colonizar e fixar nitrogênio dentro de tecidos das plantas. O processo de fixação biológica de nitrogênio é catalisado pelo complexo enzimático nitrogenase e demanda um alto custo energético. A expressão e a atividade do complexo enzimático nitrogenase são regulados, sendo reprimidos na presença de oxigênio e amônio. No centro da regulação transcricional dos genes *nif* (genes relacionados com a fixação biológica de nitrogênio), está a proteína NifA, a ativadora de transcrição desses genes. A proteína NifA de *H. seropedicae* é regulada em resposta aos níveis de oxigênio e amônio. O domínio Aminoterminal (GAF) desta proteína regula a sua atividade em resposta aos níveis de amônio, num processo que envolve a proteína GlnK. Em uma biblioteca de mutantes pontuais para *glnK*, foi obtido um mutante, o GlnK/P10L que não é capaz de ativar NifA em condições de fixação de nitrogênio. O objetivo desse projeto foi subclonar o gene *glnK* mutante presente no MCSII do vetor pETDUET1 no vetor de expressão pET29a para que essa proteína fosse expressa à partir do promotor T7. A proteína GlnK/P10L foi expressa e purificada a próxima etapa desse projeto será a sua purificação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é β -proteobacteria pertencente às Oxalobacteriaceae, o gênero recebe esse nome por possuir bactérias com formato de espiral e que se associam com plantas herbáceas, o *H. seropedicae* recebera este nome por ter sido isolado originalmente na cidade de Seropédica (BALDANI *et al.*, 1986). A bactéria *H. seropedicae* é encontrada em associação com plantas de interesse econômico como sorgo, trigo, milho e arroz (BALDANI *et al.*, 1986), posteriormente em cana-de-açúcar (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 1999), sendo capaz de promover o crescimento dessas plantas (GYANESHWAR *et al.*, 2002; el-KOMY, *et al.*, 2003; RIGGS *et al.*, 2001; DOTTO *et al.*, 2010).

1.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

Nitrogênio é um nutriente indispensável para a vida da forma como conhecemos, é um componente essencial em biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas. Sua forma mais comum, N_2 ocupa 78% do peso seco da atmosfera (PIDWIRNY, 2006), porém nesta forma não é assimilável pela grande maioria dos organismos, sendo necessária transformação em formas assimiláveis como NH_4^+ por bactérias denominadas diazotróficas, esta característica é distribuída entre os diversos grupos de bactérias como as sulfobactérias, firmibactérias, actinomicetos, cianobactérias, proteobacteria e arqueobactérias (DIXON & KAHN, 2004).

Na agricultura atual o uso de adubação nitrogenada compõe a maior contribuição antrópica ao ciclo do nitrogênio global é um sério problema ambiental, estudos mostram que esta contribui com a formação de óxido nitroso (N_2O) e óxido nítrico (NO), além de acelerar a perda da diversidade de espécies adaptadas a solos com pouco nitrogênio devido à lixiviação dos fertilizantes. Uma alternativa às consequências da adubação nitrogenada seria a FBN, que pode aumentar a produtividade ao passo que mantém o solo fértil por um período prolongado, além de

tornar a produção mais barata ao produtor (DOBENREINER, 1997), uma vez que os adubos nitrogenados são os mais caros fertilizantes para a produção agrícola (PEDROSA, 1987).

Os microrganismos utilizados como inoculantes mais comuns são rizóbios, capazes de formar nódulos nas raízes de leguminosas como no caso da soja, onde até 94% da demanda por nitrogênio pode ser suprida por FBN (HUNGRIA *et al.*, 2006), porém esses inoculantes não são eficientes na fertilização de gramíneas. Isto gera uma demanda por pesquisa com bactérias capazes de realizar simbiose com poáceas de interesse agrícola, com resultados como o advento do fertilizante para gramíneas com *Azospirillum brasiliense*, que é vendido como inoculante para milho e trigo por uma empresa de inoculantes biológicos (NITRO1000 Inoculantes Biológicos), as estirpes utilizadas, Ab-V5 e Ab-V6 foram escolhidas embasando-se em estudos de interação (HUNGRIA, 2011).

1.3 Proteína NifA

Em proteobactérias, a proteína NifA, produto do gene *nifA*, é o ativador transcricional dos genes *nif* (BUCHANAN-WOLLASTON *et al.*, 1978;). A atividade regulatória de NifA depende da ligação à subunidade σ^{54} da RNA polimerase para a formação do complexo aberto (MORETT & BUCK, 1988a), a EBP (enhancer binding protein) então se liga no consenso -12 -24 (CANNON *et al.*, 1990) NifA reconhece a UAS 5'-TGT-N10-ACA-3' como promotor (MORETT *et al.*, 1988b). Na grande maioria das proteobactérias NifA possui três domínios modulares que são estruturalmente parecidos com NtrC (MORETT & SEGOVIA, 1993; DRUMMOND *et al.*, 1986), um domínio carboxiterminal com um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA, um domínio central com atividade ATPase típico de membros da família AAA+ e um domínio aminoterminal com função regulatória (MONTEIRO, 2001).

A proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae*, foi caracterizada em 1991 por Souza e colaboradores, NifA possui 542 resíduos de aminoácidos (SOUZA *et al.*, 1991a-b) e é transcrito a partir de seu próprio promotor e também por um promotor NtrC (PEDROSA *et al.*, 1997; WASSEM, 2000), em *Azospirillum brasiliense* a expressão é constitutiva (ZOU *et al.*, 2008). Na classe das γ -proteobactérias, *nifA* está em um operon com *nifL*, a qual tem efeito inibitório sobre NifA sob condições

desfavoráveis à fixação biológica de nitrogênio (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). Em α e β proteobactérias NifL não é presente na grande maioria das espécies, e *nifA* está em um operon monocistrônico (WASSEM *et al.*, 2000).

O domínio carboxiterminal de NifA, possui um motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA comum às EBPs (enhancer binding proteins) (DRUMMOND *et al.*, 1986; LEE *et al.*, 1993). O domínio AAA+ possui uma cadeia com tamanho entre 200 a 250 aminoácidos, com os motivos conservados Walker A e Walker B envolvidos na ligação e hidrólise de ATP (HANSON & WHITEHEART, 2005), Ativadores de transcrição da família NtrC, possuem um motivo GAFTGA que não é encontrado em outras proteínas com domínio AAA+, e isto pode estar envolvido com a interação com σ^{54} (STUDHOLME & DIXON, 2003). Um motivo de resíduos de cisteína presentes neste domínio e no interdomínio Q é o responsável pela sensibilidade de NifA ao oxigênio (SOUZA *et al.*, 1999), foi proposto que essa sensibilidade ao O₂ se deve à necessidade da proteína em coordenar íons de ferro (FISCHER *et al.*, 1988; SOUZA *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 2010).

O domínio aminoterminal, também denominado GAF, é a região menos conservada da proteína (FISCHER, 1994), além de ser um módulo presente em todos os domínios de seres vivos (DIXON & KAHN, 2004). O domínio Aminoterminal é regulatório de NifA quanto aos níveis de nitrogênio intracelular (ARSENE *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999). Em *Azotobacter vinelandii* o domínio GAF sensoria os níveis de nitrogênio ligando-se à 2-oxo para modular a atividade do domínio AAA+ em resposta à interação com NifL, contudo a NifA de *Klebsiella pneumoniae* parece não ligar 2-oxoglutarato (LITTLE & DIXON, 2003). Em *H. seropedicae* e *A. brasiliense* o domínio GAF inibe a atividade de NifA (ARSENE *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999a) uma vez que mutantes N-truncados de NifA em *H. seropedicae* apresentam uma proteína sempre ativa que não responde ao nível de nitrogênio (MONTEIRO *et al.*, 1999a), ao passo que a expressão em trans desse domínio parece devolver a sensibilidade ao sinal (MONTEIRO *et al.*, 1999b).

Em *A. brasiliense*, *H. seropedicae* e *Rhodospirillum rubrum*, o domínio GAF deve interagir com proteínas GlnK ou GlnB para que NifA tenha atividade (ARSENE *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2004). O contrário acontece em *Rhodospirillum capsulatus* e *Azorhizobium caulinodans*, onde a ausência de GlnB

faz com que NifA perda a capacidade de responder aos níveis de nitrogênio (MICHEL-REYDELLET & KAMINSKI, 1999; DREPPER *et al.*, 2003). Um esquema da estrutura de NifA pode ser visualizado na figura 3, a estrutura tridimensional ainda não foi elucidada.

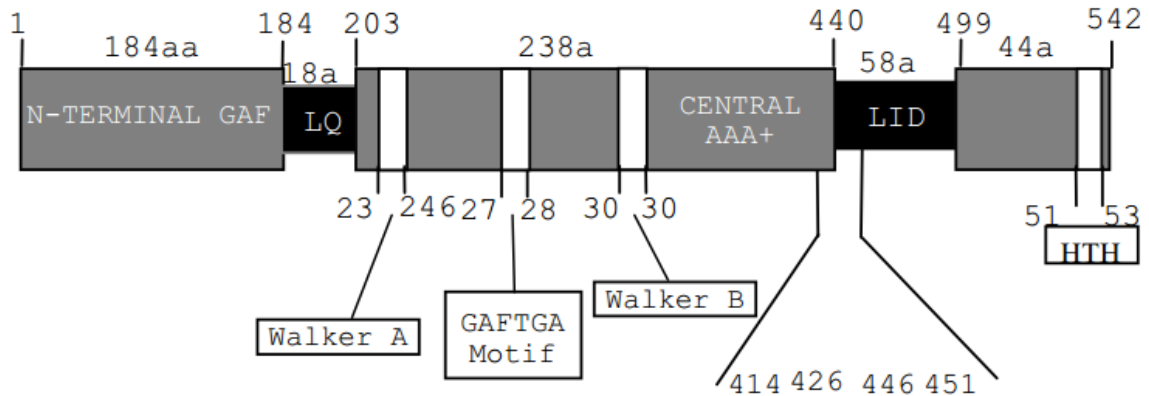


FIGURA 1 - MODELO ESQUEMÁTICO DOS DOMÍNIOS MODULARES DA PROTEÍNA NifA DE *H. seropedicae*. Os domínios Aminoterminal, central e Carboxiterminal são mostrados no modelo. No esquema estão evidenciados os motivos Walker A e Walker B, típicos de ATPases, o motivo GAFTGA, característico de proteínas da família AAA+, os resíduos 414, 426, 446 e 451 se referem às cisteínas conservadas e o motivo hélice-voltahélice que é indicado por HTH (adaptado de OLIVEIRA, 2010).

1.4 Proteína GlnK

PII é uma família de proteínas homotrímeras com habilidade de sensoriar os níveis de nitrogênio e energia da célula que está amplamente distribuída entre os grupos Bacteria, Archaea e Eukarya (NINFA & ATKINSON, 2000; ARCONDÈGUY *et al.*, 2001). *E. coli* e *K. pneumoniae* possuem genes para GlnB e GlnK (SON & RHEE, 1987; HOLTEL & ERRICK, 1988; van HEESWIJK *et al.* 1996; JACK *et al.* 1999), Em *H. seropedicae* ambas estão presentes, GlnB e GlnK, *glnB* é um operon monocistrômico com um promotor σ^{70} e é expressa constitutivamente, enquanto GlnK está em um operon com AmtB sujeito a regulação pelo sistema Ntr (BENELLI *et al.*, 1997; NOINDORF *et al.*, 2005), porém *Azotobacter vinelandii* possui apenas o gene *glnK* em um operon com *amtB*, expresso a partir de um promotor do tipo σ^{70} (MELETZUS *et al.*, 1998).

Os trímeros de PII são ligados entre si pelos resíduos 30, 32, 34, 93, 95 e 98, muito embora estes não são muito conservados (XU *et al.*, 1998). Três loops são presentes em PII, o T-loop (resíduos de 37 à 55), B-loop (resíduos de 82 à 88), e C-loop (resíduos 102 à 105) (CHEAH *et al.*, 1994; CARR *et al.*, 1996). A ligação a efetores se dá na interface entre os monômeros entre o B-loop de um monômero e o C-loop do monômero ao lado (XU *et al.*, 1998; TRUAN, 2010). O resíduo de tirosina na posição 51 é o sítio de uridililação em GlnB e GlnK de *E. coli* (NINFA & ATKINSON, 2000; ARSENE *et al.*, 1999), enquanto que em cianobactérias a uridililação acontece na serina na posição 49, algo similar ao acontece em *Clostridium longsporum* (NINFA & ATKINSON, 2000).

Em *E. coli*, a ativação de GlnK e GlnB depende da enzima bifuncional GlnD, e em baixas concentrações de nitrogênio fixado tem atividade uridil transferase, ao passo que em concentrações altas de nitrogênio, remove os grupos uridil de PII (SON & RHEE 1987; JIANG *et al.*, 1998; ATKINSON & NINFA, 1999). A atividade uridil transferase de GlnD é inibida por glutamina, sugerindo que esta é a forma pela qual GlnD sensoria os níveis de nitrogênio na célula (JIANG, PELISKA & NINFA, 1998). A uridililação de GlnK e GlnB é dependente da ligação aos efetores 2-oxo e ATP/ADP, essas ligações causam mudanças conformacionais que permitem a interação com GlnD e consequente uridililação (BONATTO *et al.*, 2012).

Além da regulação por uridililação, as proteínas PII ligam efetores que modulam a interação com seus alvos. As PII são capazes de sensoriar e integrar três sinais metabólicos diferentes: nitrogênio, energia e carbono, que são sinalizados respectivamente por glutamina, razão ATP/ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) (ARCONDÈGUY *et al.*, 2001). Os níveis de glutamina controlam a atividade GlnD, que catalisa a uridililação/desuridililação de PII. Já ATP e 2-OG regulam a uridililação das proteínas PII ligando-se diretamente a elas (KAMBEROV *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1998a), ou podem estar relacionados comente na modulação da interação de PII com outras proteínas. Em *E. coli* a variação dos níveis de 2-OG não é suficiente para influenciar a uridililação, no entanto a ligação de 2-OG em PII modula sua interação direta com proteínas-alvo (JIANG *et al.*, 1998a).

Stefanello e colaboradores (2014) isolaram uma proteína GlnK mutante, GlnKP10L, incapaz de ativar NifA. Nesse trabalho o gene *glnKP10L* foi subclonado no vetor de expressão pET29a e a proteína GlnKP10L foi expressa.

2. OBJETIVOS

- Subclonar o gene *glnKP10L* no vetor pET29a;
- Expressar a proteína GlnKP10L na estirpe BL21(λ DE3);
- Caracterizar a variante expressa quanto ao perfil de uridililação e ligação à efetores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram adquiridos das Sigma-Aldrich, Merck e JT Baker exceto quando informado. Ágar, agarose e IPTG foram adquiridos das empresas Invitrogen e Fermentas. As enzimas *XbaI/BamHI* e o tampão tango foram comprados com a empresa Fermentas. Enzimas modificadoras foram obtidas via Invitrogen.

3.2 Bactérias e Plasmídeos

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

TABELA 1 – BACTERIAS

Bactéria	Genótipo/Fenótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
BL21	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	SAMBROOK, 1989
Top10	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	SAMBROOK, 1989

TABELA 2 – PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Descrição	Referência
HsGlnKP10L	Ap ^R , contém o gene mutante <i>glnK</i> P10L de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI e <i>nifA</i> no MCSII de pETDUET1.	STEFANELLO, 2011.
pET29a	Km ^R , vetor para expressão a partir do promotor T7, com possibilidade de expressar proteínas com cauda de histidina	Novagen.
pEMB200	Km ^R , possui o gene <i>glnK</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a	BONATTO <i>et al.</i> , 2007.
pMKP10L	Km ^R , possui a variante P10L do gene <i>glnK</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a	Este trabalho.

3.3 Meios de Cultura e condições de cultivo

As células de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB – (SAMBROOK *et al.*, 1989)) ou em meio sólido Luria-Bertani-ágar (LA) dependendo da finalidade do cultivo. As células eletrocompetentes foram recuperadas em meio SOB (WARREN, 2011), as composições dos meios de cultura estão listados a seguir nas tabelas 1 e 2:

TABELA 1 – MEIO DE CULTURA LB

MEIO LURIA-BERTANI (LB)	
Extrato de levedura	5g/L
Triptona	10g/L
NaCl	10g/L

TABELA 2 – MEIO DE CULTURA SOB

MEIO SOB	
pH ajustado para 7,0 com KOH	

KCl	2,5mmol/L
Caseína hidrolisada	20g/L
NaCl	10mmol/L
Extrato de levedura	5g/L

3.4 Antibióticos

Os antibióticos utilizados neste trabalho foram pesados, ressuspensos em água milliQ e filtrados em filtros de 0,22 μ m (millipore), e utilizados nas seguintes concentrações: canamicina 100 μ g/mL, ampicilina 50 μ g/mL e estreptomicina 80 μ g/mL.

3.5 Análise eletroforética do DNA

As amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (TRIS-acetato 40mM e EDTA 1Mm, pH 8,3). As amostras foram aplicadas em poços no gel e submetidas a 50-100 V por 60-120 minutos, após o término da corrida, submetidos em uma solução de brometo de etídeo 0,5 μ L por 10-20 minutos e lavados em água corrente para serem visualizados sob luz ultravioleta (312 nm) em um transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA-USA).

Previamente à aplicação das amostras no gel, estas foram adicionadas em solução de FSUDS (azul de bromofenol 0.8%, ficol 10%, xileno cianol 0.4%, SDS 1%, EDTA 1,8mmol/L, pH 8,0) em uma proporção amostra:FSUDS de 4:1.

3.6 Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos realizadas baseadas no método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). 6 mL de cultura em fase estacionária centrifugadas à 13400rpm por 30s e ressuspensas em 0,3mL de uma solução com glucose 50 mmol/L, Tris.HCl 25 mmol/L pH 8,0, EDTA 10 mmol/L e 1 μ L de RNase Purelink

(Invitrogen). Em seguida adicionados 0,3mL de uma solução de NaOH 0.18 molar e SDS 1%, a lise teve um tempo de duração entre 30-60s e então, neutralizada com 0,3mL de Kcaf (acetato de potássio 3mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8mol/L), homogeneizada gentilmente e incubada em gelo por 15 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 13400rpm por 10 minutos e o sobrenadante fora coletado, este então, fora agitado com uma solução de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1e novamente centrifugados a 13400rpm por 10 minutos, o sobrenadante coletado então foi precipitado com 1 volume de isopropanol a -20°C por 30-120 minutos e centrifugado 13400rpm por 15minutos. O sobrenadante é descartado e uma lavagem com 1mL de etanol 70% se segue, as amostras foram então centrifugadas a 13400rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e o pellet deixado secar a 37°C.

3.7 Reações de Restrição

Se deram com o uso das endonucleases de restrição *Xba*I e *Bam*HI (Fermentas), em sistemas com 10% de amostra a ser digerida, Buffer 6 (Fermentas) e encubados à 37°C durante a noite.

Na digestão do vetor pET29a para a clonagem, ao final da reação, à amostra foi adicionada 1,0µL de fosfatase alcalina de camarão (SAP - “Shrimp Alkaline Phosphatase”(USB Corporation)) e incubada por 15 minutos à 37°C.

Todas as reações de reações de restrição foram finalizadas à 80°C por 20 minutos, em seguida precipitadas em etanol 3 volumes e lavadas com etanol 70%. A secagem realizada em estufa a 37°C.

3.8 Reações de Ligação

As reações de ligação se deram na proporção molar aproximada de 5:1 (inserto: vetor) com a T4 DNA ligase (Fermentas) seguindo as recomendações de uso do fabricante e incubadas em temperatura ambiente durante a noite.

3.9 Preparo de Célula Eletrocompetente

Inóculo de cultura de *E. coli* em fase estacionária 1:100 em meio LB e crescida sob agitação 120rpm a 37°C até uma D.O._{600nm} entre 0,6 e 0,8 (l=1cm), as culturas foram então resfriadas em gelo por aproximadamente 30 minutos e então transferidas a tubos estéreis e centrifugadas à 5000rpm 4°C por 5 minutos, lavadas em H₂O milliQ estéril à 4°C, 2 vezes e novamente em glicerol 10%, o pellet final ressuspensão no glicerol 10% remanescente do descarte do sobrenadante por inversão, foram então realizadas alíquotas de 100µL, e estas estocadas a -45°C.

As transformações se deram na aplicação de 1,0 a 5,0 µL do DNA a ser transformado na alíquota, estas então foram transferidas para cubetas de eletroporação (BioRad, cubeta de 0,2 cm – cat. no.165-2086) esterilizadas com etanol 70% por 15 minutos e resfriadas em gelo por 15-30 minutos, então aplicou-se a essas cubetas uma diferença de potencial de 1.8 kV no aparelho Gene Pulser II ® (Bio-Rad). 900µL de meio SOC foram então adicionados à cubeta, agitados e vertidos em frascos contendo 100 µL de uma solução de glucose 20% em estes frascos foram incubados por 1 hora à 37°C, depois plaqueados em meio LB com o antibiótico adequado.

3.10 Preparo de células quimiocompetentes

Para o preparo de células quimiocompetentes, uma cultura em fase estacionária foi inoculada na proporção de 1:100 em LB e crescida até uma D.O._{600nm} entre 0,4 e 0,6 (l=1cm). As culturas então foram resfriadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas à 5000rpm sob 4°C por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O Pellet foi ressuspensionado em aproximados 40mL de uma solução de MgCl₂ 100mM estéril e novamente centrifugado (4°C, 5000rpm, 10 minutos), o

sobrenadante foi descartado. O pellet foi novamente ressuscitado em aproximadamente 40mL de uma solução 100mM de CaCl_2 , o tubo contendo as células então foi deixado submerso em gelo por 20-30 minutos e centrifugado (4°C, 5000rpm, 10 minutos), o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 1mL de uma solução de CaCl_2 100mM, glicerol 15%. A solução contendo as células foi dividida em aliquotas de 100 μL e estocadas a -80°C.

Na transformação de BL21 com o pMKP10L, foram utilizados 3,0 μL de DNA plasmidial. Na transformação de TOP10 com o com o pEMB200, foi utilizado 1,0 μL de uma miniprep. A reação de ligação fora transformada utilizando 5,0 μL .

Após a adição do plasmídeo, os tubos contendo células competentes foram incubados por 30 minutos em gelo, sendo em seguida submetidos por 45 segundos em banho-maria 42°C, e devolvidas ao gelo por 2 minutos. Após esse tempo foram adicionados ao tubo 0,4mL de meio LB e encubados por 60 minutos em estufa à 37°C, então plaqueados em meio LA contendo o antibiótico adequado.

3.11 Dosagem De Proteínas

A concentração de proteína dos extratos celulares e após purificação se deu pelo método de Bradford (1976). A curva de calibração foi realizada utilizando soro albumina bovina. A leitura da D.O._{.595nm} fora realizada no aparelho ELX800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek instruments Inc.).

3.12 Teste de Expressão.

Para a expressão de GlnK e GlnKP10L um pré-inóculo de *E. coli* BL21 (λDE3) com o respectivo plasmídeo foi incubado em LB com canamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante a noite à 37°C. O inóculo final foi realizado numa proporção de 1:100 e incubado nas mesmas condições até uma D.O._{.600nm} de 0,4. Então foi adicionado IPTG até uma concentração final de 0,5mM e incubado por 3 horas à 30°C. Após esse tempo as culturas foram centrifugadas a 5000rpm e o sobrenadante descartado.

Nos testes de expressão, foram utilizados 10mL de cultura, que então foram ressuscitados em 400 μL de tampão A (NaCl 50mM; Tris HCl pH 8,0 50mM). Em

seguida estas amostras foram sonicadas em 10 sessões de 5 segundos com intervalos de 5 segundos, uma aliquota desse extrato é chamada de extrato bruto. Se deu então nova centrifugação e o sobrenadante (Extrato solúvel) e o pellet (após ressuspendido em 30 μ L de tampão A) fora aplicado em gel de poliacrilamida 15% (SDS-page).

3.13 Eletroforese De Proteínas Sob Condições Desnaturantes (SDS – PAGE)

A análise eletroforética de proteínas em condições desnaturantes se deu conforme descrito por Laemmli, (1970) em gel de poliacrilamida 15%. As amostras contendo proteína foram diluídas em tampão de amostra desnaturante (60 mM TrisHCl, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8) e aquecidas a 97°C por 5 minutos antes da aplicação no gel.

As corridas foram realizadas por 60 minutos à 150V em tampão de corrida (3 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 0,1% SDS). Ao final, os géis foram tratados com uma solução corante de azul de Coomassie (metanol 50%; água 40%; ácido acético 10%; Brilliant Blue R 0,55 g/L) por 60 minutos e o excesso extraído com uma solução descorante (50% metanol, 40% água, 10% ácido acético).

TABELA 3 – GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE

Gel separador	15%	Gel de empilhamento	4%
H ₂ O	3,645 mL	H ₂ O	3,152 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,3 mL
SDS 10%	100 μ L	SDS 10%	50 μ L
Acrilamida 40%	3,75 mL	Acrilamida 40%	487,5 μ L
PA 10%	100 μ L	PA 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L	TEMED	10

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem do gene mutante *glnK* no vetor pET29a

O plasmídeo HsglnKP10L (STEFANELLO, 2011) foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I/*Bam*HI (figura 2) e o fragmento liberado (336pb) contém o gene *glnK* mutagenizado.

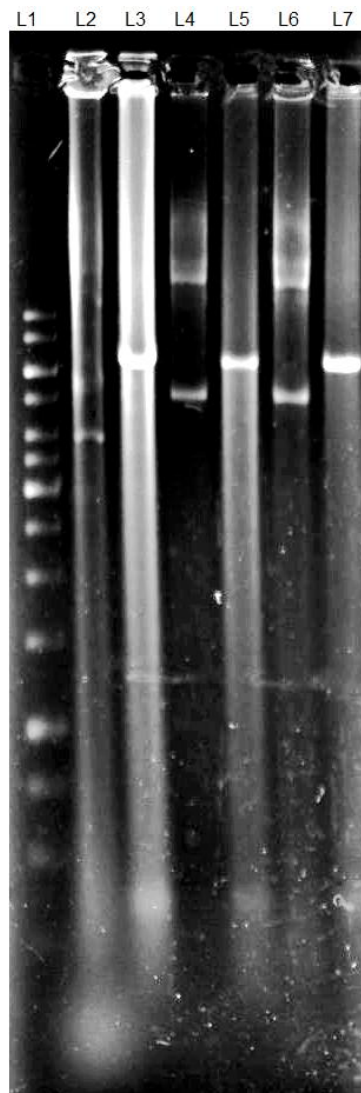


FIGURA 2 – ELETROFORESE DE CONFIRMAÇÃO HsglnKDNifA. L1: marcador; L2, L4 e L6: diferentes amostras de HsglnKDNifA extraídas como no item 3.6; L3, L5 e L7: restrição *Xba*I/*Bam*HI das amostras à esquerda de cada respectivamente, todas liberaram inserto.

O fragmento referente ao gene *glnK* mutagenizado foi ligado ao vetor pET29a e transformado em *E. coli* TOP10 quimiocompetente. Os plasmídeos de 12 colônias foram extraídos e digeridos com *Xba*I/*Bam*HI. Na figura 3 podemos observar que o plasmídeo marcado com a flecha vermelha liberou um inserto de aproximadamente

336 pb. Esse plasmídeo foi novamente digerido e foi feita uma nova eletroforese (figura 4), aonde foi possível confirmar a subclonagem do gene mutante *glnK* no vetor pET29a.

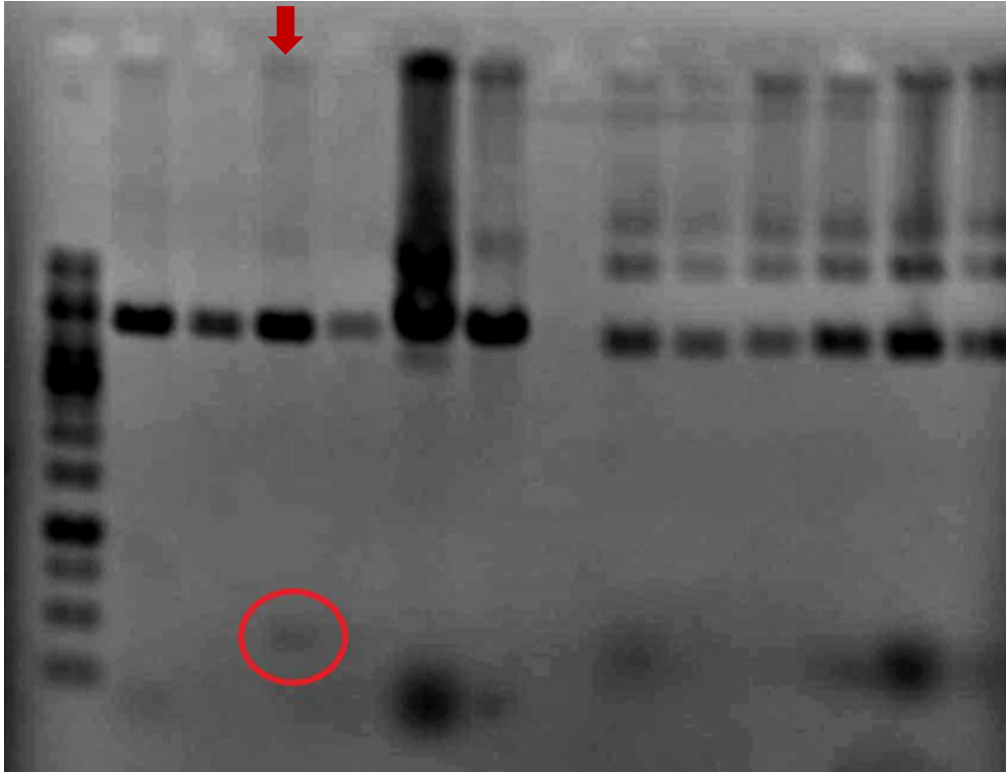


FIGURA 3 – ELETROFORESE DE CONFIRMAÇÃO DA SUBCLONAGEM I. L1 – marcador, a última banda corresponde a 250 pb e a penúltima à 500 pb; As demais linhas contem os plasmídeos isolados digeridos com *XbaI/BamHI*.



FIGURA 4 - ELETROFORESE DE CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM II. a primeira linha refere-se ao marcador, a última banda representa 500pb, na segunda linha, pMKP10L, na terceira linha a restrição com *XbaI/BamHI* do plasmídeo contendo o gene *glnK* mutante (pMKP10L).

4.2 Expressão da proteína GlnKP10L

Após a confirmação da subclonagem, o plasmídeo pMKP10L foi transformado em *E. coli* BL21 (λ DE3) pelo protocolo de célula quimiocompetente.

Analisando o perfil protéico da bactéria contendo o plasmídeo pMKP10 (figura 5) nota-se uma alta taxa de expressão da proteína GlnKP10L (2-extrato bruto – 3- fração solúvel – 8 – fração insolúvel) após indução com IPTG, comparando-se com as linhas controles (1-extrato bruto – 4- fração solúvel – 7 – fração insolúvel). A banda que corresponde a essa proteína apresenta taxa de migração de aproximadamente 15kDa, a mesma taxa de migração da proteína GlnK selvagem (3-extrato bruto – 6- fração solúvel – 9 – fração insolúvel). Cerca de 50% da proteína expressa está presente na fração solúvel (linha 3).

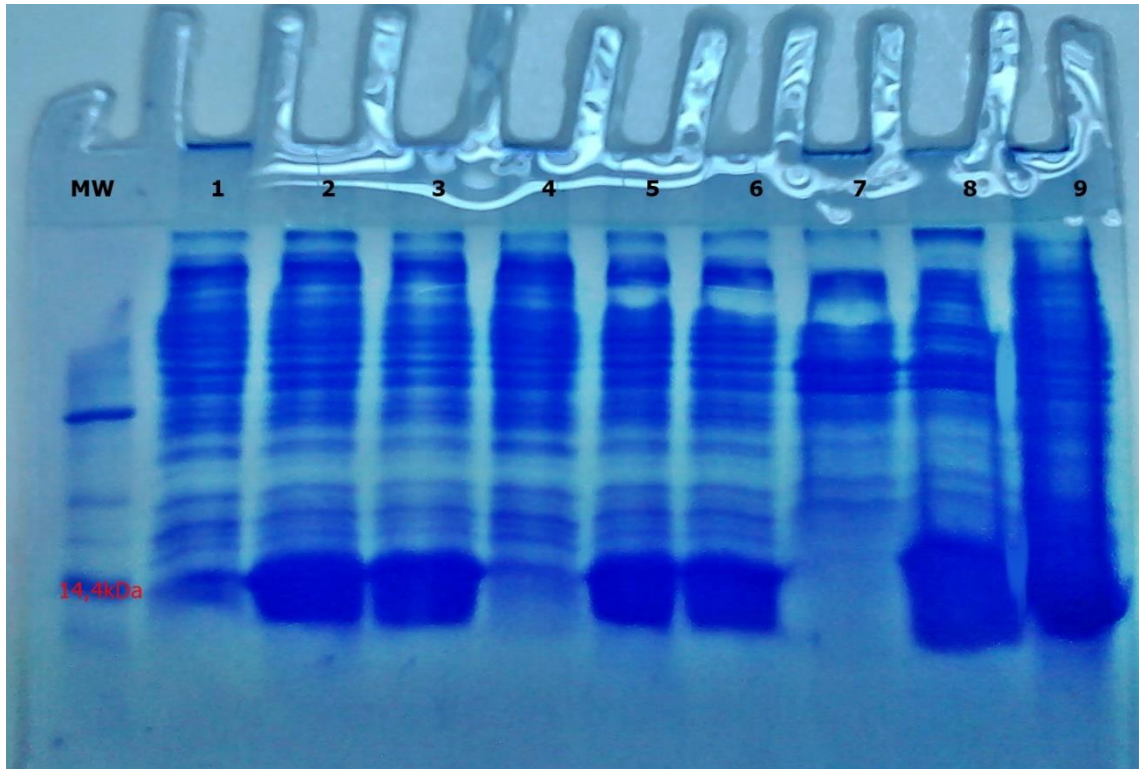


FIGURA 5 – TESTE DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnKP10L. MW: Marcador de massa molecular, 1: extrato bruto de BL21, 2: Extrato bruto de BL21/pMKP10L, 3: extrato bruto de BL21/pEMB200, 4: extrato solúvel de BL21, 5: extrato solúvel de BL21/pMKP10L, 6: extrato solúvel de BL21/pEMB200, 7: extrato insolúvel de BL21, 8: extrato insolúvel de BL21/pMKP10L e 9: extrato insolúvel de BL21/pEMB200.

A proteína GlnKP10L será purificada e caracterizada. A caracterização dessa proteína é importante para que possamos definir porque ela não consegue ativar a proteína NifA. Podemos sugerir que esta proteína que não consiga ativar NifA pois talvez não possa ser uridililada, uma vez que o sítio P10 fica numa α -hélice próxima ao próximo à Y51 que é o resíduo onde GlnD adiciona UMP, é possível também que este resíduo seja crítico para a ligação com efetores, porém isso só será possível de se analisar após os testes de ligação a efetores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 1, p.80-105, 2001.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA Aminoterminal 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 Aminoterminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol.Lett.**, v. 179, p. 339-343, 1999.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov., a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Biology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

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.

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 Expression and Purification**, v. 55, n. 2, p. 293-299, 2007.

BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M.A.; MONTEIRO, R. A.; CHUBATSU, L. S.; HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O. Uridylylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate in vitro. **Arch. Microbiol.**, v.194, p. 643–652, 2012.

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

CANNON, W. V.; KREUTZER, R.; KENT. H. M.; MORETT, E.; BUCK, M. Activation of the *Klebsiella pneumoniae nifU* promoter: identification of multiple and overlapping upstream NifA binding sites. **Nucl.Acids Res.**, v. 18, p. 1693-1701, 1990.

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 Crystallog.** 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 transduction protein PII. **Structure**, v. 2, p. 981–990, 1994.

DIXON, R. KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 8, 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*. **Microbiology**, v. 149, p. 2203-2212, 2003.

DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntnC* and *NifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO Journal**, v. 5, n. 2, p. 441-447, 1986.

EL-KOMY, H. M. A.; SAAD, O. A. O.; HETTA, A. M. A. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using ¹⁵N-dilution method. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 6, p. 787-793, 2003.

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. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 152-386, 1994.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.

HANSON, P. I.; WHITEHEART, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. **Nature reviews: molecular cell biology**, v. 6, p. 519-529, 2005.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. **Contribution of biological nitrogen fixation to the Nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America.** In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K. (Ed.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity.** Houston: Studium Press, LLC, 2006. p.43-93.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo.** n. 325. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.

JACK, R.; ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The Signal Transduction Protein GlnK Is Required for NifL-dependent Nitrogen Control of nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1156-1162, 1999.

JIANG, P.; PELISKA, J.A.; NINFA, A.J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, v. 37, p. 12782-12794, 1998.

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.

LEE, H.-S.; BERGER, D. K.; KUSTU, S. Activity of purified NIFA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 90, p. 2266-2270, 1993.

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.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifLNifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 601 -610, 2004.

MELETZUS, D.; RUDNICK, P.; DOETSCH, N.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-amtB* Operon of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 3260-3264, 1998.

MICHEL-REYDELLET, N.; KAMINSKI, A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK Proteins Control Nitrogen Fixation and Ammonia Assimilation. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 2655-2658, 1999.

MONTEIRO, R. A. **Análise funcional dos domínios modulares da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. 194f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2001.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS letters**, v. 447, p. 283-286, 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 Aminoterminal domain. **FEMS microbiology letters**, v. 180, p. 157-161, 1999b.

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. 11469-11488, 1988.

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.; SEGOVIA, L. The σ_{54} Bacterial Enhancer Binding-Protein Family: Mechanism of Action and Phylogenetic Relationship of Their Functional Domains. *J. Bacteriol.*, v. 175, p. 6067-6074, 1993.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157-164, 1999.

NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 172-179, 2000.

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

CHUBATSU, L.S. Characterization of the *orf1glnkamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185 (1), p. 55-62, 2005.

OLIVEIRA, M. A. S. **Estudo da regulação da atividade da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* em resposta aos níveis de amônio e oxigênio.** 105 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2010.

PEDROSA, F. O. Fixação Biológica de Nitrogênio: fértil ideia. **Ciência hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.

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

PIDWIRNY, M. Atmospheric Composition. **Fundamentals of Physical Geography**, 2nd Ed., 2006.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLET, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 829-836, 2001.

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

SON H. S.; RHEE S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 8690–8695, 1987.

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.; DRUMMOND, M.; RIGO L.U.; YATES M. G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA Activity by Ammonium Ions and Oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 681–684, 1999.

STEFANELLO, A. A. **Identificação de Resíduos de Aminoácidos Importantes para a Ativação de NifA por PII em *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2014. Tese (mestrado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

STUDHOLME, D. J.; DIXON, R. Domain Architectures of σ^{54} -Dependent Transcriptional Activators. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1757-1767, 2003.

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. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, p. 531-539, 2010.

van HEESWIJK, W.; HOVING, S.; MOLENAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 133-146, 1996.

WASSEM, R; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. D.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent NifA promoter. **Molecular microbiology**, v. 35, n. 4, p. 756-764, 2000.

WARREN, D. J. Preparation of highly efficient electrocompetent *Escherichia coli* using glycerol/mannitol density step centrifugation. **Analytical Biochemistry**, v. 413, p. 206-207, 2011.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; VASUVEDAN, S. G.; OLLIS, D. L. GlnK, a PII-Homologue: Structure Reveals ATP Binding Site and Indicates how the T-loops may be Involved in Molecular Recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, p. 149-165, 1998.

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.; LI J.; ZHANG Y.; ROBERTS G. P. Identification and functional characterization of NifA variants that are independent of GlnB activation in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 154, n. 9, p. 2689-2699, 2008.