

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANO ALVES STEFANELLO

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE NifA DE *H. seropedicae* POR PROTEÍNAS PII EM
RESPOSTA AOS NÍVEIS DE AMÔNIO

CURITIBA

2018

ADRIANO ALVES STEFANELLO

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE NifA DE *H. seropedicae* POR PROTEÍNAS PII EM
RESPOSTA AOS NÍVEIS DE AMÔNIO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica pelo Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro

Co-orientadores: Prof. Dr. Marco Aurélio S. de Oliveira
Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Stefanello, Adriano Alves

Regulação da atividade de NifA de *H. seropedicae* por proteínas PII em resposta aos níveis de amônio. / Adriano Alves Stefanello. – Curitiba, 2018. 225 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Rose Adele Monteiro

Co-orientador: Marco Aurélio S. de Oliveira

Co-orientador: Emanuel Maltempi de Souza

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Nitrogênio - Fixação. 2. Herbaspirillum. Título. II. Monteiro, Rose Adele. III. Oliveira, Marco Aurélio S. de. IV. Souza, Emanuel Maltempi. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 581.13347



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ADRIANO ALVES STEFANELLO** intitulada: **REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE NIHA DE *H. Seropedicae* POR PROTEÍNAS PII EM RESPOSTA AOS NÍVEIS DE AMÔNIO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Março de 2018.

ROSE ADELE MONTEIRO
Presidente da Banca Examinadora

HERNÁN FRANCISCO TEREZI
Avaliador Externo

ELAINE MACHADO BENELLI
Avaliador Interno

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS
Avaliador Interno

FABIANE GOMES DE MORAES REGO
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Prof^a Dr^a Rose Adele Monteiro, pela disposição e paciência para orientar este trabalho ao longo desses anos. Agradeço muito o apoio incondicional recebido para alterar planos e tentar experimentos diferentes, especialmente nos momentos em que parecia que nada iria dar certo.

Agradeço também ao professores Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Marco Aurélio Schüller de Oliveira pela disponibilidade de coorientar este trabalho. Ao (agora professor!) Marco Aurélio de Oliveira, agradeço a ajuda experimental com os as partes do trabalho que envolveram a purificação e caracterização de proteínas PII.

Agradeço ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN), e a todos os demais integrantes do NFN pelo apoio constante. Muito especialmente, agradeço aos nossos técnicos Valter Baura e D. Roseli Prado pela dedicação constante ao trabalho, que é o que permite ao laboratório funcionar bem para todos.

Agradeço ao professor Ray Dixon, F. R. S., pela excelente orientação recebida durante o estágio no exterior, e pelas discussões sempre úteis e sempre bem dispostas, sem as quais este trabalho não teria progredido da mesma maneira. Agradeço também à Dr^a. Corinne Appia-Aymé e ao Dr. Richard Little pelo auxílio e boa companhia no dia-a-dia do laboratório em Norwich.

Agradeço aos colegas e amigos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, tanto os que aqui ainda estão quanto os que hoje se encontram em outras instituições. Se fosse listar todos não haveria espaço, então menciono apenas os que conheço há mais tempo, com quem mais convivi, e com quem mais tive oportunidade de aprender: Dr^a. Anelis Marin, Dr. Marco Antônio Kadowaki, Dr^a. Edileusa Marques Gerhardt, Dr. Eduardo Balsanelli, Dr. Thiago Estefano Rodrigues, Dr. Robson Carlos Alnoch, Dr. Marcelo Bueno Batista, e Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

Agradeço à minha família, pelo apoio constante que sempre me deu.

Agradeço bastante ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica pela oportunidade de realizar o doutorado nesta instituição.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de estudos concedida, ao CNPq, Institutos do Milênio, INCT-FBN, Fundação Araucária e BBRSC pelo apoio financeiro aos dois laboratórios em que trabalhei. Menção especial seja feita ao programa Ciência Sem Fronteiras, que financiou minha estadia no exterior durante a realização do estágio sanduíche.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma β -proteobactéria diazotrófica endofítica encontrada em vasos xilemáticos de gramíneas de interesse econômico, como milho, trigo, e sorgo, onde contribui para aumentar o crescimento vegetal através da fixação de nitrogênio e da produção de fitormônios. Neste organismo, a fixação biológica de nitrogênio é regulada através do controle da expressão dos genes *nif* (que codificam a enzima nitrogenase e as demais proteínas necessárias à sua maturação) mediado pelo ativador transcricional NifA. Além de possuir sensibilidade intrínseca a oxigênio, NifA tem sua atividade reprimida na presença de íons amônio. Esta repressão é mediada por seu próprio domínio GAF N-terminal, possivelmente devido a interações diretas entre resíduos do GAF e do restante da proteína. A interação do domínio GAF com a proteína GlnK alivia a inibição de NifA pelo domínio GAF sob condições de baixa concentração de amônio, e a desrepressão parece requerer a ligação de GlnK a ATP e 2-oxo-glutarato (2OG) e a uridililação de GlnK por GlnD. Neste trabalho, utilizou-se o processo de mutagenese sítio-dirigida de *glnK* para testar a importância da uridililação e da interação desta proteína com seus efetores para a ativação de NifA. Realizou-se também a mutagenese aleatória de *glnK* para tentar localizar resíduos importantes para interação com NifA. Os resultados mostram que a capacidade de interação de GlnK com ATP é absolutamente essencial e a interação com 2OG é o principal requerimento para a ativação de NifA por GlnK. Diferente do observado em outros organismos, a uridililação de GlnK parece não ter efeito sobre a ativação de NifA. As substituições aleatórias inativadoras de GlnK concentraram-se na face superior do trímero de PII, próxima do T-loop, sugerindo ser esta a região responsável pela interação com NifA. Realizou-se também a construção de variantes quiméricas de NifA insensíveis a oxigênio para uso em experimentos de mutagenese aleatória, que permitiram identificar ao menos 26 substituições inativadoras localizados entre os resíduos 14-164 de NifA e 11 substituições ativadoras concentradas entre os resíduos 176-193. A distribuição espacial e a identidade das substituições, somada à caracterização do estado de oligomerização da proteína quimérica utilizada nos experimentos, levaram a propor um mecanismo de regulação de NifA por controle do estado de oligomerização, análogo ao observado em NifH de *Aquifex aeolicus*.

Palavras-chave: NifA, *Herbaspirillum seropedicae*, fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic diazotrophic β -proteobacterium found in the xylem vessels of economically important grasses, such as maize, wheat, and sorghum, where it supports plant growth through nitrogen fixation and phytohormone production. In this organism, biological nitrogen fixation is regulated by the transcriptional activator NifA, which controls the expression of the *nif* genes (which encode the nitrogenase enzyme and the other proteins necessary for its maturation). In addition to having intrinsic oxygen sensitivity, NifA has its activity repressed in the presence of ammonium ions. This repression is mediated by its own N-terminal GAF domain, possibly due to intramolecular interactions between residues in the GAF and the rest of the protein. The interaction of the GAF domain with GlnK alleviates NifA inhibition under conditions of low fixed nitrogen, and NifA derepression seems to require the binding of GlnK to ATP and 2-oxo-glutarate (2OG), and the uridylation of GlnK by GlnD. In this work, site-directed mutagenesis of *glnK* was used to test the importance of uridylation and the importance of GlnK interaction with ATP and 2OG for the activation of NifA. Random mutagenesis of *glnK* was also performed to try to locate residues important for protein-protein interaction. The results show that the interaction of GlnK with ATP is absolutely essential and the interaction with 2OG is the main requirement for the activation of NifA by GlnK. Unlike in other organisms, the uridylation of GlnK appears to have no effect on the activation of NifA. Random substitutions inactivating GlnK were concentrated on the upper face of the PII trimer, near the T-loop, suggesting this surface to be the region responsible for interaction with NifA. Oxygen-insensitive NifA chimeric variants were also constructed to be used in random mutagenesis experiments, which allowed the identification of at least 26 inactivating substitutions located between residues 14-164 of NifA and 11 activating substitutions concentrated between residues 176-193. The spatial distribution and identity of the substitutions, together with the characterization of the chimeric protein's oligomerization state in solution, led to the proposal of control of the oligomerization state as a mechanism of NifA regulation, similar to what was proposed for *Aquifex aeolicus* NifH.

Key-words: NifA, *Herbaspirillum seropedicae*, biological nitrogen fixation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regulação da assimilação de amônio em <i>E. coli</i> .	27
Figura 2 - Regulação da transcrição da assimilação do amônio em <i>E. coli</i> .	32
Figura 3 - Vista lateral do trímero de GlnZ de <i>A. brasilense</i> (PDB 3MHY).	36
Figura 4 - Ligação de ATP, ADP, e 2OG a PII desidrilada.	38
Figura 5 - Representação esquemática da uridilação seqüencial de PII em proteobactérias.	40
Figura 6 - Representação das proteínas Fe e FeMo que compõe a nitrogenase.	43
Figura 7 - Ciclos de redução das proteínas Fe e FeMo.	45
Figura 8 - Genes de fixação de nitrogênio de <i>H. seropedicae</i> .	50
Figura 9 - Dois modelos de regulação de NifA.	57
Figura 10 - Representação esquemática de NifA de <i>H. seropedicae</i> .	63
Figura 11 - Representação esquemática do uso de OE-PCR para a geração de genes contendo mutações pontuais (A) e para a construção de genes quiméricos (B).	90
Figura 12 - Atividade de β -galactosidase detectada em culturas expressando hsNifA e variantes de hsGlnK sob alta indução.	104
Figura 13 - Atividade de β -galactosidase detectada em culturas expressando hsNifA e variantes de hsGlnK sob ausência de indução.	105
Figura 14 - Purificação de hsGlnB, hsGlnK, hsGlnK K58M, hsGlnK G89A, e hsGlnK Δ (45-54).	107
Figura 15 - Espectro de dicroísmo circular de hsGlnB, hsGlnK K58M, hsGlnK G89A, e hsGlnK Δ (45-54) entre 190 e 300nm.	108
Figura 16 - Avaliação do estado de uridilação de variantes de hsGlnK após o experimento de uridilação.	109
Figura 17 - Gráficos obtidos dos experimentos de ligação de (A) 2OG a hsGlnK K58M na presença de 3 mM ATP e (B) de ATP a hsGlnK G89A na ausência de outros efetores.	111
Figura 18 - Gráficos obtidos dos experimentos de ligação de ATP a hsGlnK, hsGlnK K58M, e hsGlnK Δ (45-54), na ausência de outros efetores.	112
Figura 19 - Atividade de β -galactosidase detectada em culturas de <i>E. coli</i> JM109(λ DE3)pRT22 expressando hsNifA e variantes de hsGlnK em baixa indução.	113
Figura 20 - Alinhamento de hsGlnB, hsGlnK, abGlnB, abGlnZ, ecGlnB, e avGlnK.	114
Figura 21 - Localização dos resíduos de aminoácidos diferenciais entre abGlnZ e as demais proteínas PII avaliadas (hsGlnB, hsGlnK, ecGlnB, AbGlnB, avGlnK) na estrutura de abGlnZ (PDB 3MHY).	116
Figura 22 - Localização dos resíduos de aminoácidos substituídos durante o experimento de mutagenese aleatória na estrutura de abGlnZ.	121

Figura 23 - Representação gráfica da seleção de mutantes de GAF.....	126
Figura 24 - Alinhamento de diversas proteínas NifA, destacando a região correspondente aos resíduos 390-466 de hsNifA (473-549 do alinhamento).....	132
Figura 25 - Localização das regiões de junção entre hsNifA e avNifA.	134
Figura 26 - Alinhamento de dos primeiros 300 resíduos de hsNifA com os resíduos presentes nas estruturas 4G3K, 4L4U, e 3NHQ.	148
Figura 27 - Localização dos resíduos de aminoácidos substituídos durante o experimento de mutagênese aleatória em três modelos estruturais do domínio GAF de hsNifA.	149
Figura 28 - Predição de estrutura secundária de hsNifA realizada com as ferramentas GOR4, Jpred, e PSIPRED.	152
Figura 29 - Localização de G25 no modelo estrutural 1 de GAF de hsNifA (baseado na estrutura 4G3K).	155
Figura 30 - Alinhamento de NifAs mostrando um trecho Q-linker.....	157
Figura 31 - Teste de expressão e solubilidade de his-hs409-417av[xhoI] comparada com outras proteínas.....	159
Figura 32 - Teste de expressão e solubilidade de his-hs409-417av[xhoI] expressa sob diferente níveis de indução.	160
Figura 33 - Teste de solubilidade de his-hs409-417av[xhoI] em diferentes tampões.	161
Figura 34 - Purificação de his-hs409-417av[xhoI].	163
Figura 35 - Frações de his-hs409-417av eluídas durante análise por SEC em coluna Superose 12 10/300 GL.	165
Figura 36 - Análise por SDS-PAGE de frações eluídas de MagneHis após os ensaios de interação.	166
Figura 37 - Mecanismo fisiológico proposto para a regulação da atividade de hsNifA em resposta a amônio.	168

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GENES <i>nif</i> DE <i>H. seropedicae</i>	51
TABELA 2 – ANTIBIÓTICOS	70
TABELA 3 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	71
TABELA 4 – <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	85
TABELA 5 – SISTEMA DE REAÇÃO PARA SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	91
TABELA 6 – SISTEMAS DE RESTRIÇÃO	92
TABELA 7 – GÉIS PARA SDS-PAGE	96
TABELA 8 - GEL PARA ELETROFORESE NATIVA	96
TABELA 9 – MUTANTES INATIVADORES DE <i>hsGlnK</i>	118
TABELA 10 – DESCRIÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS	134
TABELA 11 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE CÉLULAS EXPRESSANDO AS QUIMERAS DE <i>NifA</i>	139
TABELA 12 – MUTANTES ALEATÓRIOS DE <i>hs409-417av[xhoI]</i>	143
TABELA 13 – INFORMAÇÕES DOS MODELOS ESTRUTURAIS CONSTRUÍDOS PARA GAF DE <i>HsNifA</i>	147
TABELA 14 – POSIÇÃO DAS MUTAÇÕES INATIVADORAS DE <i>hs409-417av[xhoI]</i> NO MODELO 1	150
TABELA 15 – COMPARAÇÃO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DA FBN EM α E β - PROTEOBACTÉRIAS	170

LISTA DE ABREVIATURAS

2OG	2-oxoglutarato (α -cetoglutarato)
AAA+	[<i>família de proteínas</i>] ATPases associadas a diversas atividades celulares
acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACT	[<i>domínio proteico</i>] Domínio associado a aspartato quinase, corismato mutase e TyrA
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
Ap	Ampicilina
APS	Persulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
AR	[<i>domínio proteico</i>] Adenilil removase
AT	[<i>domínio proteico</i>] Adenilil transferase
Atase/AR	Adenililtransferase/Adenilil-removase
ATP	Adenosina trifosfato
BE	Tampão borato-EDTA
bEBP	<i>Bacterial enhancing binding protein</i>
cat. no.	Número de catálogo
CD	Dicroísmo circular
Cm	Cloranfenicol
CTP	Citosina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Mistura equimolar de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
$\text{DO}_{600\text{nm}}$	Densidade óptica (absorbância) medida com comprimento de onda de 600nm
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, $(\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídeo
FBN	Fixação biológica do nitrogênio
FMN	Flavina mononucleotídeo
GAF	[<i>domínio proteico</i>] Domínio associado a fosfodiesterases cGMP-específicas, adenilil ciclases e FhIA
GDH	Glutamato desidrogenase

GHKL	<i>[domínio proteico]</i> Domínio ATPásico associado a girase, Hsp90, histidina quinases e MutL
GOGAT	Glutamina-oxoglutarato aminotransferase
GS	Glutamina sintetase
H	<i>[domínio proteico]</i> Subdomínio helical encontrado em histidina quinases
HD	<i>[domínio proteico]</i> Domínio fosfohidrolase contendo resíduos conservados de histidina e aspartato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etanosulfônico, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S
HTH	<i>[domínio proteico]</i> Domínio de ligação ao DNA contendo um motivo hélice-volta-hélice
IDT	<i>[empresa]</i> Integrated DNA Technologies
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
KacF	Mistura de acetato de potássio e ácido fórmico
Kd	Constante de dissociação
kDa	kiloDaltons
Km	Kanamicina
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LA	Meio de cultivo <i>Lysogeny Agar</i>
LB	Meio de cultivo <i>Lysogeny broth</i>
m/v	Massa/volume
MCSI	Sítio de policlonagem 1 do vetor pETDuet1 e derivados
MCSII	Sítio de policlonagem 2 do vetor pETDuet1 e derivados
mRNA	RNA mensageiro
N ₂ ase	Nitrogenase
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Nal	Ácido nalidíxico
NEB	<i>[empresa]</i> New England Biolabs
NFDM	<i>NH₄⁺-free Davis minimal medium</i>
NT	<i>[domínio proteico]</i> Nucleotidiltransferase
NtrC-P	NtrC fosforilado no resíduo de aspartato 54
OE-PCR	<i>Overlap extension PCR</i>

ONPG	<i>orto</i> -nitrofenil- β -galactopiranosídeo
PAS	[<i>domínio proteico</i>] Domínio associado a Per, Arnt e Sim
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG6000	Polietilenoglicol com massa molar numérica média de 6000 Daltons
Pi	Fosfato inorgânico, PO_4^{2-}
PII-UMP	PII com grupo uridilil ligado ao resíduo de tirosina 51
rpm	Rotações por minuto
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SDS	Dodecilsulfato de sódio, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SEC	Cromatografia de exclusão de tamanho
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	<i>Super optimal broth with carbohydrate</i>
sRNA	<i>Small RNA</i> ; RNA curto não codificante, não transportador, e não ribossomal
Tc	Tetraciclina
TEMED	Tetrametiletilenodiamina, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Tm	Temperatura de fusão
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$
UMP	Uridina monofosfato
Utase/UR	Uridililtransferase/Uridilil-removase
UTP	Uridina trifosfato
UV	Luz ultravioleta
UVB	Luz ultravioleta B (302nm)
UVC	Luz ultravioleta C (254nm)
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	17
1.2.	METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PROTEOBACTÉRIAS.....	19
1.2.1.	Aquisição e assimilação do amônio	19
1.2.2.	Regulação da assimilação de amônio	21
1.2.3.	Alteração da expressão gênica em resposta aos níveis de amônio	28
1.2.4.	Regulação do metabolismo de nitrogênio em <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ..	33
1.3.	PROTEÍNAS PII	34
1.4.	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	41
1.4.1.	Controle da fixação biológica de nitrogênio	46
1.4.2.	Fixação de nitrogênio em <i>H. seropedicae</i>	49
1.5.	PROTEÍNAS NifA	56
1.6.	A PROTEÍNA NifA DE <i>H. seropedicae</i>	63
2.	JUSTIFICATIVA.....	69
3.	OBJETIVOS.....	69
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	70
4.1.	REAGENTES	70
4.2.	ANTIBIÓTICOS	70
4.3.	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	71
4.4.	MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	79
4.5.	MANIPULAÇÃO DE MICRORGANISMOS	80
4.5.1.	Cultivo regular de <i>E. coli</i>	80
4.5.2.	Preparo de <i>E. coli</i> quimiocompetente e termotransformação.....	80
4.5.3.	Preparo de <i>E. coli</i> eletrocompetente e transformação	81
4.5.4.	Determinação de atividade de β -galactosidase em <i>E. coli</i>	82
4.5.5.	Expressão de GlnK para purificação	83
4.5.6.	Expressão de his-hs409-417av[xhoI] para purificação.....	83
4.6.	FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA	84
4.6.1.	Edição e análise de seqüências	84
4.6.2.	Bases de dados.....	84
4.6.3.	Alinhamento de seqüências.....	84

4.6.4.	Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	84
4.6.5.	Predição de estrutura secundária e modelagem estrutural	87
4.6.6.	Construção de árvore de distância evolutiva	87
4.6.7.	Cálculo de propriedades físico-químicas de proteínas	87
4.6.8.	Visualização de estruturas tridimensionais de proteínas.....	88
4.6.9.	Quantificação relativa de proteínas por densitometria	88
4.7.	MANIPULAÇÃO DO DNA.....	88
4.7.1.	Análise eletroforética de DNA.....	88
4.7.2.	Purificação de fragmentos de DNA.....	88
4.7.3.	Amplificação de DNA.....	89
4.7.4.	Amplificação mutagênica de DNA	89
4.7.5.	Mutagenese sítio dirigida por OE-PCR	89
4.7.6.	Seqüenciamento de DNA	91
4.7.7.	Digestão com endonucleases de restrição	91
4.7.8.	Geração de pontas cegas.....	92
4.7.9.	Ligação de fragmentos de DNA.....	92
4.7.10.	Extração de DNA plasmidial	92
4.7.11.	Seleção de plasmídeos recombinantes	93
4.7.12.	Preparo de vetores para reações de ligação	94
4.7.13.	Preparo de vetor pTZ57R/T para clonagem T/A	94
4.7.14.	Quantificação do DNA por espectrofotometria.....	94
4.8.	MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS	95
4.8.1.	Determinação da concentração de proteínas	95
4.8.2.	SDS-PAGE.....	95
4.8.3.	Eletroforese não desnaturante de proteínas	96
4.8.4.	Purificação de variantes de NifA.....	96
4.8.5.	Purificação de PII	97
4.8.6.	Espectro de dicroísmo circular (CD)	97
4.8.7.	Uridililação de variantes de GlnK	98
4.8.8.	Análise de ligação de efetores a PII por calorimetria	98
4.8.9.	Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC).....	98
4.8.10.	Ensaio de <i>pull-down</i>	99
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
5.1.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PII SOBRE NifA.....	100

5.1.1.	Construção de plasmídeos para coexpressão de NifA e variantes de PII ..	101
5.1.2.	Avaliação da ativação de hsNifA por variantes de hsGlnK em <i>E. coli</i>	103
5.1.3.	Purificação de variantes de GlnK de <i>H. seropedicae</i>	106
5.1.4.	Dicroísmo circular de variantes de PII	107
5.1.5.	Uridililação de mutantes pontuais de GlnK	109
5.1.6.	Capacidade de ligação a efetores de variantes de PII	110
5.1.7.	Avaliação da ativação de NifA por diversas proteínas PII em <i>E. coli</i>	112
5.1.8.	Busca por resíduos relevantes para a ativação de NifA por PII	114
5.1.9.	Mutagênese aleatória de GlnK	117
5.1.10.	Discussão: regulação de hsNifA por PII, e regiões de PII importantes para a ativação de hsNifA	122
5.2.	ESTUDO DA INIBIÇÃO DE NifA POR SEU DOMÍNIO GAF	125
5.2.3.	Justificativa e planejamento	125
5.2.4.	Construção do vetor Dxho* e de plasmídeos com a construção <i>nifA</i> [<i>xho</i>]	127
5.2.5.	Primeira tentativa de mutagênese aleatória de hsNifA	128
5.2.6.	Construção de variantes de NifA insensíveis a oxigênio	129
5.2.7.	Predição de estrutura secundária e desenho das quimeras	133
5.2.8.	Construção dos plasmídeos codificando proteínas quiméricas N-truncadas	135
5.2.9.	Construção dos plasmídeos codificando proteínas quiméricas e hsGlnK ..	136
5.2.10.	Construção dos plasmídeos codificando proteínas quiméricas e hsGlnK com a substituição G89A	137
5.2.11.	Avaliação da atividade das quimeras de hsNifA e avNifA	138
5.2.12.	Construção de plasmídeos para a mutagênese aleatória de hs409-417av (introdução do sítio <i>Xho</i> I em hs409-417av)	141
5.2.13.	Mutagênese aleatória de hs409-417av	142
5.2.14.	Localização das substituições de hs409-417av[<i>xho</i>] em um modelo estrutural do domínio GAF	146
5.2.15.	Discussão: modelo de regulação de hs409-417av[<i>xho</i>]I, inibição <i>in trans</i> ou <i>in cis</i>	153
5.2.16.	Construção de plasmídeos para superexpressão de his-hs409-417av	157
5.2.17.	Testes de expressão e solubilidade	158
5.2.18.	Purificação de his-hs409-417av	162
5.2.19.	Análise de his-hs409-417av por cromatografia de exclusão de tamanho ..	164

5.2.20. Ensaios de interação por <i>pull-down</i>	165
5.3. DISCUSSÃO: MODELO DE REGULAÇÃO DE hsNifA EM RESPOSTA A AMÔNIO.	166
6. CONCLUSÕES	171
REFERÊNCIAS	172
APÊNDICE 1 – ALINHAMENTO DE NifAs	203
APÊNDICE 2 – ÁRVORE DE PROXIMIDADE DE SEQUÊNCIA ENTRE PROTEÍNAS NifA DE DIVERSOS ORGANISMOS	219
APÊNDICE 3 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE his-hs409-417av[xhoI] CALCULADOS COM O PROGRAMA PROTPARAM	220
ANEXOS – MAPAS PLASMIDIAIS	222

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum* (β -Proteobacteria, Burkholderiales; Oxalobacteriaceae), descrito inicialmente por Baldani e colaboradores (1986), atualmente compreende 10 espécies reconhecidas de acordo com as regras do *International Code of Nomenclature of Bacteria* (PARTE, 2014): *H. aquaticum* (DOBRITSA *et al.*, 2010), *H. autotrophicum* (DING e YOKOTA, 2004), *H. chlorophenolicum* (IM *et al.*, 2004), *H. frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001), *H. hiltneri* (ROTHBALLER *et al.*, 2006), *H. huttiense* (DING e YOKOTA, 2004) ssp *huttiense* e ssp *putei* (DOBRITSA *et al.*, 2010), *H. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2006), *H. rhizosphaerae* (JUNG *et al.*, 2007), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996), *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986). Há também ao menos uma espécie não plenamente reconhecida (*H. chemoriales*, LU e SHI, 2013) e diversos isolados pouco caracterizados (ELBELTAGY *et al.*, 2001; WEBER *et al.*, 2001; ZIGA *et al.*, 2010; CHENG *et al.* 2017).

Cinco espécies anteriormente reconhecidas como parte do gênero (*H. aurantiacum*, *H. canariense* e *H. soli* – CARRO *et al.*, 2012; *H. massiliense* – LAGIER *et al.*, 2012; e *H. psychrotolerans* – BAJERSKI *et al.*, 2013) foram reclassificadas em novo gênero filogeneticamente próximo, *Noviherbaspirillum* (LIN *et al.*, 2013; CHAUDHARY e KIM, 2017), que também inclui *N. agri* (CHAUDHARY e KIM, 2017), *N. autotrophicum* (ISHII *et al.*, 2017), *N. denitrificans* (ISHII *et al.*, 2017), *N. humi* (SUNDARARAMAN *et al.*, 2016), *N. malthae* (LIN *et al.*, 2013), e *N. suwonense* (KIM *et al.*, 2014). Outro gênero evolutivamente próximo, *Paraherbaspirillum*, contém apenas uma espécie (*Paraherbaspirillum soli* – ANANDHAM *et al.*, 2013).

A maioria das espécies de *Herbaspirillum* (e dos dois gêneros próximos) foi isolada de solo, de amostras vegetais ou de ambientes aquáticos; quatro espécies são endofíticas em gramíneas (*H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense* e *H. hiltneri*), uma foi isolada de nódulos de feijão (*H. lusitanum*), e outra foi encontrada associada à rizosfera de *Allium victorialis* (*H. rhizosphaerae*). Quatro espécies (*H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *H. lusitanum*) possuem capacidade de fixar nitrogênio atmosférico.

Herbaspirillum seropedicae (BALDANI *et al.*, 1986), a espécie-tipo do gênero, é uma bactéria diazotrófica não-patogênica isolada da rizosfera e de raízes de arroz, milho e sorgo, segundo a descrição inicial; a sequência do genoma da estirpe SmR1 foi publicada por Pedrosa e colaboradores em 2011. As células de *H. seropedicae* possuem dimensões de (1,5-5,0) x (0,6-0,7) micrômetros de comprimento, morfologia vibrióide, com 1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos. Este organismo possui preferência por ambientes microaeróbicos, e pode ser cultivado em uma faixa de pH entre 5,3 e 8,0, e entre 22 e 38°C, com preferência por temperaturas mais próximas de 30°C. *H. seropedicae* tem preferência

por ácidos orgânicos (malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato) como fonte de carbono, mas também é capaz de metabolizar aerobicamente glucose, galactose, L-arabinose, manitol, sorbitol, glicerol e frutose. Como a maioria das bactérias, este organismo tem preferência por amônio como fonte de nitrogênio, embora também utilize NO_3^- e N_2 atmosférico como fontes alternativas quando amônio não está disponível.

Embora a espécie tenha sido descrita inicialmente como habitante da rizosfera, um estudo posterior caracterizou seu modo de vida como sendo predominantemente endofítico, com a maior parte das células ocupando o sistema vascular xilemático (OLIVARES *et al.*, 1996; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). *H. seropedicae* foi posteriormente encontrado em amostras de cana-de-açúcar, capim-elefante, *Panicum maximum* e outras dez espécies de gramíneas (OLIVARES *et al.*, 1996); também foi recuperado de banana e abacaxi (CRUZ *et al.*, 2001; WEBER *et al.*, 1999), indicando que, a despeito da preferência por gramíneas, *H. seropedicae* é capaz de colonizar outras monocotiledôneas no ambiente natural.

A capacidade de colonização endofítica, fixação de nitrogênio atmosférico, e produção de fitormônios (BASTIÁN *et al.*, 1998; RADWAN *et al.*, 2004) fazem desta bactéria um organismo com importante potencial biotecnológico para a promoção de crescimento vegetal em gramíneas comercialmente importantes. A habilidade de fixar nitrogênio é especialmente promissora, uma vez que este macronutriente costuma ser o principal fator limitante para a produtividade vegetal em ambientes terrestres (LEBAUER e TRESEDER, 2008), em especial em culturas agrícolas (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2010).

Estudos realizados em milho (ARAÚJO *et al.*, 2014; CANELLAS *et al.*, 2013; DOTTO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2015), trigo (NEIVERTH *et al.*, 2014), sorgo (PEREIRA *et al.*, 1989), e arroz (PEREIRA *et al.*, 1989; HOSEINZADE *et al.*, 2016) mostraram aumentos na produtividade vegetal após inoculação com *H. seropedicae*. Ao menos uma parte do aumento de produtividade vegetal induzida por *H. seropedicae* pode ser atribuída à fixação biológica do nitrogênio no interior dos vasos xilemáticos; foi demonstrado que os genes *nif* de *H. seropedicae*, que codificam proteínas necessárias para a fixação de nitrogênio, são transcritos *in planta* (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003), e a fixação de nitrogênio no tecido vegetal foi demonstrada na presença de carbono abundante (GYANESHWAR *et al.*, 2002; JAMES *et al.*, 2002; PANKIEVICZ *et al.*, 2015). Outros estudos mostraram a presença de grande quantidade de nitrogênio proveniente da atmosfera em plantas inoculadas com *H. seropedicae*, se comparadas a controles não inoculados – cerca de 30-54% do nitrogênio total de plantas de arroz (BALDANI *et al.*, 2000, JAMES *et al.*, 2002), 24,6-26,5% em plantas de trigo (el-KOMY *et al.*, 2003), e 14,4% em plantas de milho (SANTOS *et al.*, 2015).

1.2. METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM PROTEOBACTÉRIAS

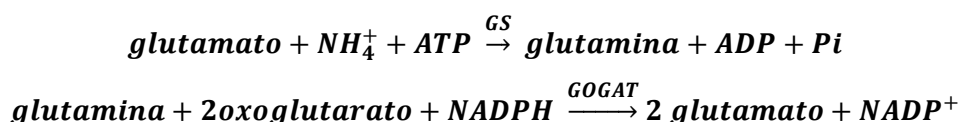
Bactérias apresentam preferência por usar amônio como fonte de nitrogênio, devido a seu estado reduzido facilitar a incorporação em esqueletos carbônicos com menor gasto energético¹. O amônio é também o produto das reações de fixação de dinitrogênio e de redução de nitrato, de modo que todo o nitrogênio obtido por estas vias também deve ser incorporado ao metabolismo celular pelas mesmas vias de assimilação de amônio. As etapas envolvidas na obtenção e incorporação de amônio foram estudadas em detalhe em *Escherichia coli* (van HEESWIJK *et al.*, 2013), e estudos pontuais de componentes dos mesmo sistemas em outros organismos indicam grande similaridade do metabolismo primário de nitrogênio entre as proteobactérias.

1.2.1. Aquisição e assimilação do amônio

A membrana celular é impermeável aos íons amônio (NH_4^+), embora permita a passagem da forma desprotonada desta espécie química, a amônia (NH_3), que existe em baixa concentração em solução (KLEINER, 1981). Estima-se que quando a concentração extracelular de amônio está acima de 1 mM, a permeação de NH_3 é suficiente para atender aos requisitos do metabolismo de bactérias (KLEINER, 1985, *apud* ZHENG *et al.*, 2004); abaixo desta concentração, a difusão de amônia através da membrana não é eficiente, de modo que a aquisição de amônio do meio extracelular depende da expressão de transportadores específicos. Estes transportadores interagem com o amônio extracelular dissolvido (NH_4^+) e realizam o transporte passivo de sua forma desprotonada (NH_3) através de um canal hidrofóbico (BADAY *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2004). Em *E. coli*, o principal transportador de amônio é denominado AmtB (SOUPENE *et al.*, 1998), e pertence à superfamília Amt/MEP/Rh de transportadores de amônio que é ubíqua em todos os grupos de organismos (ANDRADE e EINSLE, 2007). Estes transportadores aparentam ser a principal via de transporte de amônio em todos os seres vivos conhecidos (von WIRÉN e MERRICK, 2004). AmtB é uma proteína trimérica com massa total de ~90 kDa, com cada monômero dotado de onze hélices transmembranas que formam um canal específico para o transporte passivo de amônio/metilamônio na forma desprotonada (NH_3) (ZHENG *et al.*, 2004; JAVELLE *et al.*, 2008). O transporte de amônio por AmtB é sujeito a inibição por interação com a proteína GlnK (discutido na seção 1.2.2) e a regulação transcricional do gene *amtB* (discutido na seção 1.2.3).

¹ No entanto, é importante notar que bactérias costumam manter esta preferência por amônio mesmo quando aminoácidos estão disponíveis como fonte de nitrogênio, embora a assimilação destes últimos supostamente não requeira maior dispêndio de energia. É possível que a preferência por amônio nesta situação reflita a necessidade de manter uma vantagem competitiva com as demais células, evitando o vazamento de amônio para competidores no meio de cultura (WANG *et al.*, 2016).

Cada íon amônio transportado para o interior da célula ou produzido pelas vias alternativas de obtenção de nitrogênio deve ser inicialmente incorporado a uma molécula de 2-oxoglutarato (2OG) para gerar uma molécula de glutamato, que por sua vez pode ser empregado como doador de grupos amino para a síntese de outros aminoácidos em reações catalisadas por aminotransferases (EC 2.6.1). A assimilação do amônio a glutamato ocorre por meio de duas vias metabólicas distintas, denominadas GS-GOGAT e GDH de acordo com as enzimas empregadas em cada uma. A via GS-GOGAT realiza a incorporação do amônio em duas etapas, ambas mostradas abaixo:



A primeira etapa da via é catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS, GlnA), produto do gene *glnA*². GS é um homododecâmero com massa molar total de ~625 kDa cujos monômeros dispõem-se em dois anéis sobrepostos de seis unidades cada (VALENTINE *et al.*, 1968), com as duas camadas hexaméricas conectadas pelas porções C-terminais de cada monômero (YAMASHITA *et al.*, 1989). Os sítios ativos localizam-se na interface entre monômeros vizinhos, e cada sítio contém dois íons Mg²⁺ ou Mn²⁺ necessários para a catálise. Esta enzima possui alta afinidade por NH₄⁺ (K_m = 0,1 mM – ALIBHAI e VILLAFRANCA, 1994), e é a via preferencial em *E. coli* para a assimilação de amônio em baixas concentrações.

O produto da primeira etapa da reação, glutamina, pode ser usado como substrato para a segunda etapa de reação, catalisada pela enzima GOGAT, ou ser empregada diretamente como doador de grupos amino para a síntese de nucleotídeos (juntamente com aspartato – TURNBOUGH e SWITZER, 2008; ZHANG *et al.*, 2008).

A segunda etapa da via GS-GOGAT é catalisada pela enzima glutamato sintase (glutamina 2-oxo-glutarato amino transferase, GOGAT), produto dos genes *gltBD*, que possui alta afinidade por seus substratos glutamina e 2OG (K_{Gln} = 0,18 mM e K_{2OG} = 7 µM – RENDINA e ORME-JOHNSON, 1978). A enzima é um heterodímero com massa total de 218 kDa, e possui um cofator FAD, um cofator FMN, e três clusters de ferro-enxofre essenciais à sua atividade de redução de 2-oxoglutarato (MEERS e STADTMAN, 1972; van HEESWIJK *et al.*, 2013). Ao final das duas etapas, cada molécula de glutamato sintetizada a partir de amônio através desta via possui um custo metabólico total de 1 ATP e 1

² O gene *glnA* codifica a proteína GSI, que é a glutamina sintetase mais comum em procariotos e é o objeto da descrição subsequente nesta seção. Uma outra enzima, GSII, é encontrada em eucariotos e também como uma segunda GS em alguns procariotos, como *Bradyrhizobium japonicum* (DARROW e KNOTTS, 1977) e *Agrobacterium* (FUCHS e KEISTER, 1980). Genes para uma terceira e quarta foram localizados em algumas outras bactérias (MERRICK e EDWARDS, 1995).

equivalente redutor, o que explica a necessidade de regulação da atividade desta via de assimilação para evitar gasto energético desnecessário.

Uma segunda via de assimilação de amônio, menos produtiva do que a via GS-GOGAT, realiza a síntese de glutamato diretamente a partir de NH_4^+ e 2OG, segundo a equação



Esta reação é catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), produto do gene *gdhA*. GDH é um homohexâmero com massa molar total de 275 kDa e seis sítios catalíticos (LIN e REEVES, 1991); em *E. coli*, GDH (tal qual GOGAT) requer especificamente NADPH como cofator (SAKAMOTO *et al.*, 1975). Esta reação é metabolicamente menos custosa do que a catalisada pela via GS-GOGAT, pois prescinde de ATP; no entanto, GDH possui afinidade muito mais baixa por seus substratos do que GS ($K_m = 1 \text{ mM}$ para amônio – VERONESE *et al.*, 1975), tornando a assimilação por GDH restrita às situações de alta concentração de amônio (HELLING, 1998). Uma vez que a reação de síntese de glutamato catalisada por GDH é reversível nas condições termodinâmicas adequadas (van HEESWIJK *et al.*, 2013), é possível que GDH também esteja envolvida na desaminação de glutamato (e produção de amônio) observada quando *E. coli* é cultivada na presença de excesso de glutamato e limitação de glucose (SENIOR, 1975).

Quatro outras proteínas de *E. coli* são capazes de ligar amônio a esqueletos carbônicos: NAD sintetase (produto de *nadE*, ou *efg*), carbamoil fosfato sintetase (*carAB*; seu substrato preferido é glutamina, e sua afinidade por amônio é baixa), e duas asparagina sintetases (*asnA* e *asnB*, também possuem preferência por glutamina). A contribuição destas enzimas para a assimilação de amônio é bastante baixa em comparação com a das duas vias descritas em maior detalhe (van HEESWIJK *et al.*, 2013).

1.2.2. Regulação da assimilação de amônio

A variação ambiental na disponibilidade de íons amônio ou de fontes alternativas de nitrogênio, somada ao custo energético das reações catalisadas por GS/GOGAT e GDH, impõe a necessidade de regulação do processo de assimilação de amônio em bactérias, a fim de minimizar o gasto energético e adotar o estado metabólico mais adequado para o uso da fonte de nitrogênio disponível no momento. Esta regulação inicia-se com o controle da atividade das enzimas que assimilam amônio e do transportador que permite a entrada deste íon nas células.

Para que a regulação mencionada ocorra, quatro outras proteínas (além das enzimas GS, GOGAT, GDH e do transportador de amônio AmtB) estão diretamente

envolvidas no monitoramento da disponibilidade de amônio e regulação da atividade do transporte e das vias de assimilação de amônio em *E. coli*: Adenililtransferase/Adenilil removase (ATase/AR, GlnE), PII (GlnB), GlnK, e Uridililtransferase/Uridilil removase (UTase/UR, GlnD). No organismo modelo *E. coli*, GlnK e UTase/UR são responsáveis pela regulação do canal de amônio AmtB, ao passo que ATase/AR, GlnB, e UTase/UR estão envolvidas na modulação da atividade de GS.

2-oxo-glutarato e glutamina são os principais metabólitos cuja concentração reflete os níveis de amônio; em *E. coli*, a concentração de 2OG intracelular altera-se de 10 para 0,4 mM e a concentração de glutamina altera-se entre 1 e 60 mM quando as células são cultivadas sob concentração limitante de nitrogênio reduzido e então transferidas para um meio rico em amônio; a concentração de glutamato, outro metabólito importante na via de assimilação de amônio, varia apenas duas vezes (de 100 a 200 mM) nesta situação (YUAN *et al.*, 2009). O consenso tem reconhecido o papel central do monitoramento da concentração intracelular de 2OG, simultaneamente um intermediário do ciclo do ácido cítrico e um substrato para a assimilação de amônio, para regulação do metabolismo de nitrogênio e de carbono (HUERGO e DIXON, 2015).

A atividade de GS, a primeira enzima da principal via de assimilação de amônio em *E. coli*, é negativamente regulada na presença de altas concentrações de glutamina (seu produto) e de amônio (seu substrato), presumivelmente para evitar a assimilação (energeticamente custosa) de mais amônio do que o estritamente necessário para o crescimento bacteriano. Atividade da enzima é diretamente inibida por diversos produtos de vias metabólicas à jusante da assimilação de amônio, entre eles alanina, glicina, histidina, triptofano, CTP, AMP, carbamoil fosfato, glucosamina-6-fosfato, (WOOLFOLK e STADTMAN, 1967).

Curiosamente, nem glutamina nem altas concentrações de amônio são inibidores diretos de GS; seu efeito sobre esta enzima é exercido através da proteína ATase/AR, que adiciona um grupo 5'-adenilil a um resíduo de tirosina conservado (SHAPIRO e STADTMAN, 1968) quando a disponibilidade de amônio é alta, liberando pirofosfato, e remove este mesmo grupo adenilil quando a concentração de amônio diminui, liberando ADP (ANDERSON *et al.*, 1970). Qualquer quantidade de monômeros (de 1 a 12) pode ser modificada por GlnE. Esta regulação de GS por adenililação está presente em *E. coli* e outras proteobactérias (e também em streptomicetos, mas não em *Bacillus* e *Chlostridium* – MERICK e EDWARDS, 1995). Além de apresentar atividade muito mais baixa do que a proteína não-adenilada, GS-AMP ainda é mais sensível à inibição alostérica por produtos (KINGDON e STADTMAN, 1967) e tem preferências diferentes pelos íons Mg^{2+} e Mn^{2+} quando comparada com GS não modificada (GINZBURG *et al.*, 1970; MAURIZI e GINSBURG, 1982).

A proteína responsável pela regulação pós-traducional da atividade de GS é denominada ATase/AR (GlnE; inicialmente descrita como proteína PI identificada por Shapiro (1969) e caracterizada por Anderson *et al.* (1970) e por Anderson e Stadtman (1971)), e é uma proteína bifuncional contendo dois domínios nucleotídltransferase (NT) conectados por uma região central de cerca de 200 resíduos de aminoácidos. O domínio C-terminal (AT) catalisa a adição do grupo 5'-adenilil a GS na presença de glutamina e altas concentrações de amônio, liberando pirofosfato, e o domínio N-terminal (AR) remove o grupo adenilil nas condições contrárias (JIANG, PIOSZAK, e NINFA, 2007), liberando ADP. A atividade desta enzima deve ser necessariamente controlada para evitar um ciclo fútil de adenililação/desadenililação: em *E. coli*, GlnE possui um sítio de interação com glutamina localizado no domínio AT C-terminal (JIANG e NINFA, 2009); a interação de GlnE com glutamina estimula a atividade do domínio AT³.

Além de ser regulada diretamente pela interação com glutamina, a atividade de GlnE também responde à interação com a proteína GlnB (BROWN *et al.*, 1971), que monitora os níveis intracelulares de 2-oxoglutarato. GlnB, por sua vez, também sofre uma modificação pós-traducional relevante em resposta ao nível de amônio intracelular.

GlnB, inicialmente denominada PII (ANDERSON e STADTMAN, 1971), foi um dos primeiros componentes da regulação do metabolismo de amônio a ser descoberto (juntamente com GlnE, então denominado PI – SHAPIRO, 1969), e tem sido desde então um dos principais alvos de estudo dentre as proteínas do sistema de assimilação de nitrogênio devido a seu papel central no sensoreamento e sua tratabilidade para experimentos *in vitro*. A partir da descoberta de parálogos de PII em diferentes organismos, inclusive em *E. coli* (van HEESWIJK *et al.*, 1996), o termo “PII” passou a ser usado mais comumente para descrever qualquer proteína pertencente à família PII, ao passo que o regulador principal da assimilação de amônio – geralmente codificado por um gene presente na vizinhança de *glnA* ou *nadE* (SANT’ANNA *et al.*, 2009) – passou a ser comumente chamado de GlnB. A grande quantidade de conhecimento acumulado sobre as proteínas PII é assunto de revisões periódicas da literatura (NINFA e ATKINSON, 2000; ARCONDÉGUY, JACK, e MERRICK, 2001; NINFA e JIANG, 2005; FORCHHAMMER, 2008; HUERGO, CHANDRA, e MERRICK, 2013).

Tal como as demais proteínas da família PII, GlnB é uma proteína trimérica de pequeno tamanho (112 resíduos em *E. coli* e na absoluta maioria das proteobactérias) que possui três sítios idênticos de interação com micromoléculas (efetores), localizado entre as faces de contato entre os monômeros (HUERGO, CHANDRA e MERRICK, 2013). Os sítios

³ A interação de GlnE com glutamina foi caracterizada em *E. coli*, mas não está presente em todos os outros organismos. O estudo da proteína GlnD em *Rhodospirillum rubrum*, por exemplo, não encontrou evidência desta regulação direta da atividade de GlnE por glutamina (JOHNSON, TEIXEIRA, E NORDLUND, 2007).

de ligação a efetores de GlnB possuem alta afinidade por ATP/ADP, que competem pelo mesmo sítio de ligação, e por 2-oxoglutarato, que interage com o sítio somente na presença de ATP, e cuja presença aumenta a afinidade de GlnB por ATP (KAMBEROV, ATKINSON e NINFA, 1995). A interação de GlnB com diferentes efetores induz alterações conformacionais funcionalmente relevantes. Em GlnB de *E. coli*, a ligação de sucessivas moléculas de 2OG apresenta cooperatividade negativa, com cada sítio sucessivamente ocupado aumentando a constante de dissociação de 2OG do próximo sítio (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998); a ocupação dos três sítios, portanto, requer alta concentração intracelular de 2OG, indicando baixa concentração de amônio intracelular. Uma vez ligada a ATP e 2OG, GlnB de *E. coli* (e de outras proteobactérias) torna-se alvo para a uridililação do resíduo de tirosina 51 catalisada pela uridililtransferase (GlnD) (JAGGI *et al.*, 1996).

GlnD, assim como GlnE, é uma proteína bifuncional que catalisa tanto a adição quanto a remoção do grupo nucleotídico a uma proteína alvo; no caso de GlnD, a adição/remoção de um grupo uridilil monofosfato ao resíduo de tirosina 51 (Y51) de proteínas PII, entre elas GlnB. A arquitetura de GlnD difere da de GlnE. GlnD possui quatro domínios: um domínio N-terminal que possui o motivo de nucleotidil transferase (NT), seguido de um domínio HD (ARAVIND e KOONIN, 1998) e dois domínios ACT (GRANT, 2006). O domínio NT é responsável pela atividade de uridililtransferase (transferindo UMP para o resíduo Y51 de PII a partir de UTP), ao passo que o domínio HD catalisa a remoção hidrolítica de uridilil; os dois domínios ACT restantes estão envolvidos na regulação da atividade de GlnD, que responde aos níveis intracelulares de glutamina (ZHANG *et al.*, 2010). Sua estrutura e mecanismo de ação são menos compreendidos que os de GlnE.

Em condições de excesso de amônio, quando a concentração intracelular de glutamina é elevada, o domínio ACT C-terminal de GlnD liga-se a glutamina, causando a inibição da atividade de uridililtransferase no domínio NT e a estimulação da atividade de remoção de uridilil do domínio HD (ZHANG *et al.*, 2010)⁴, esta última presumivelmente por aumento da afinidade por GlnB uridililada (GlnB-UMP); ambas as atividades são estimuladas pela ligação de 2OG a GlnB (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998). Assim, GlnD catalisa a uridililação de GlnB na ausência de glutamina/amônio, e a remoção do grupo uridilil quando a concentração de glutamina/amônio aumenta.

O estado de uridililação e a interação de GlnB com seus efetores são importantes para o controle da atividade de GlnE, segundo se observou em estudos *in vitro* (JIANG, PIOSZAK, e NINFA, 2007; JIANG e NIFA, 2009). Quando a concentração de amônio é

⁴ Cumpre notar que há diferenças no modo de regulação de GlnD de diferentes organismos, e é provável que mais diferenças sejam observadas à medida que homólogos destas proteínas forem caracterizados em mais procariotos; em *Rhodospirillum rubrum*, por exemplo, glutamina não inibe a uridilação de PII (JONSSON e NORDLUND, 2007). A direção geral da regulação não varia muito, mas os detalhes ocasionalmente divergem entre os organismos.

baixa, GlnB encontra-se uridililada e ligada a mais de uma molécula de 2OG, e interage com o domínio AT de GlnE estimulando a atividade do domínio AR, que então catalisa a ativação de GS através da remoção do grupo adenilil. A ligação de 2OG a GlnB não é necessária para a interação, mas aumenta consideravelmente a ativação do domínio AR (JIANG, MAYO, e NINFA, 2007), e provavelmente ocorre *in vivo*. Inversamente, quando amônio é abundante, GlnB encontra-se desuridililada (e ligada a no máximo uma molécula de 2OG por trímico), e interage com o domínio AR de GlnE estimulando a atividade do domínio AT. A interação de GlnE com glutamina (que ocorre quando amônio é abundante), além de estimular a atividade do domínio AT, contribui para aumentar a afinidade do domínio AR por PII (JIANG, PIOSZAK, e NINFA, 2007).

Em resumo, a regulação da assimilação de amônio por GS é produto de uma cascata de regulação envolvendo as proteínas GS, GlnE, GlnB e GlnD dirigida primariamente pelas concentrações intracelulares de 2OG e glutamina. Quando há abundância de amônio, os níveis intracelulares de glutamina são elevados e os de 2OG são baixos; nestas condições, GlnD interage com glutamina, o que inibe sua atividade de uridililtransferase e estimula sua atividade de remoção de uridilil, provocando a desuridililação de GlnB. Simultaneamente, o domínio AT de GlnE interage com glutamina, o que estimula sua atividade de adenililtransferase; GlnB desuridililada interage com o domínio AR de GlnE, reforçando a estimulação da atividade do domínio AT, o que leva à adenilação de GS, com consequência diminuição de sua atividade. GS adenililada torna-se mais sensível à inibição por seus reguladores alostéricos, presentes em alta concentração devido à abundância de nitrogênio.

Inversamente, a falta de amônio leva à depleção do *pool* intracelular de glutamina e ao aumento da concentração de 2OG. Nesta situação, não há glutamina em concentração suficiente para interagir com GlnD, o que leva ao estímulo de sua atividade de uridililtransferase e inibição da atividade de remoção de uridilil; GlnB encontra-se ligada a 2OG, o que estimula ainda mais a atividade de uridililação, convertendo GlnB em GlnB-UMP. GlnB-UMP interage com o domínio AT de GlnE, estimulando a atividade do domínio AR, que remove os grupos uridilil de GS, tornando-a mais ativa.

Em contraste com a complexa regulação pós traducional de GS, GOGAT parece não ter sua atividade controlada em bactérias. GDH, responsável pela via alternativa de assimilação de amônio, parece ser inibida somente por altas concentrações de 2-oxoglutarato e NH_4^+ em *E. coli* (SHARKLEY e ENGEL, 2008).

E. coli e diversas outras proteobactérias possuem uma segunda proteína PII, denominada GlnK (van HEESWIJK *et al.*, 1996), cujo gene localiza-se no mesmo operon que *amtB* e cuja função parece ser mais intimamente relacionada com a regulação do

transportador de amônio AmtB⁵. Tal qual GlnB, GlnK também liga-se a ATP e 2OG e também sofre uridililação catalisada por GlnD em baixa concentração de amônio. Seu alvo principal, porém, parece ser o transportador AmtB; na presença de alta concentração de amônio, GlnK encontra-se desuridililada e sem ligação a 2OG e, neste estado, consegue interagir com AmtB na membrana plasmática bloqueando o fluxo de íons amônio através do canal (COUTTS *et al.*, 2002). Nesta interação, cada monômero de GlnK bloqueia um dos três poros de transporte de amônio do trímero de AmtB (CONROY *et al.*, 2007). Inversamente, quando a concentração de amônio é baixa, GlnK liga-se a ATP e 2OG e dissocia-se de AmtB; sua subsequente uridililação por GlnD torna-a incapaz de interagir com AmtB, permitindo a internalização de amônio através do canal. Este sistema de regulação parece ser bastante conservado, como é posto em evidência pela ligação genética entre os genes *glnK* e *amtB* (JAVELLE e MERRICK, 2005).

A figura 1 representa os principais processos do transporte e assimilação de amônio via GS discutidos nesta seção.

⁵ Nem todas as proteobactérias possuem dois parálogos de PII. Organismos que possuem apenas uma proteína PII (como *A. vinelandii*) tendem a possuir apenas GlnK (a proteína PII coexpressa com AmtB), que neste caso exerce as funções que em *E. coli* são realizadas tanto por GlnB quanto por GlnK. Dentre organismos que possuem dois ou mais parálogos de PII, nem sempre há grande diferença funcional entre as proteínas (como em *H. seropedicae* – NOINDORF *et al.*, 2011).

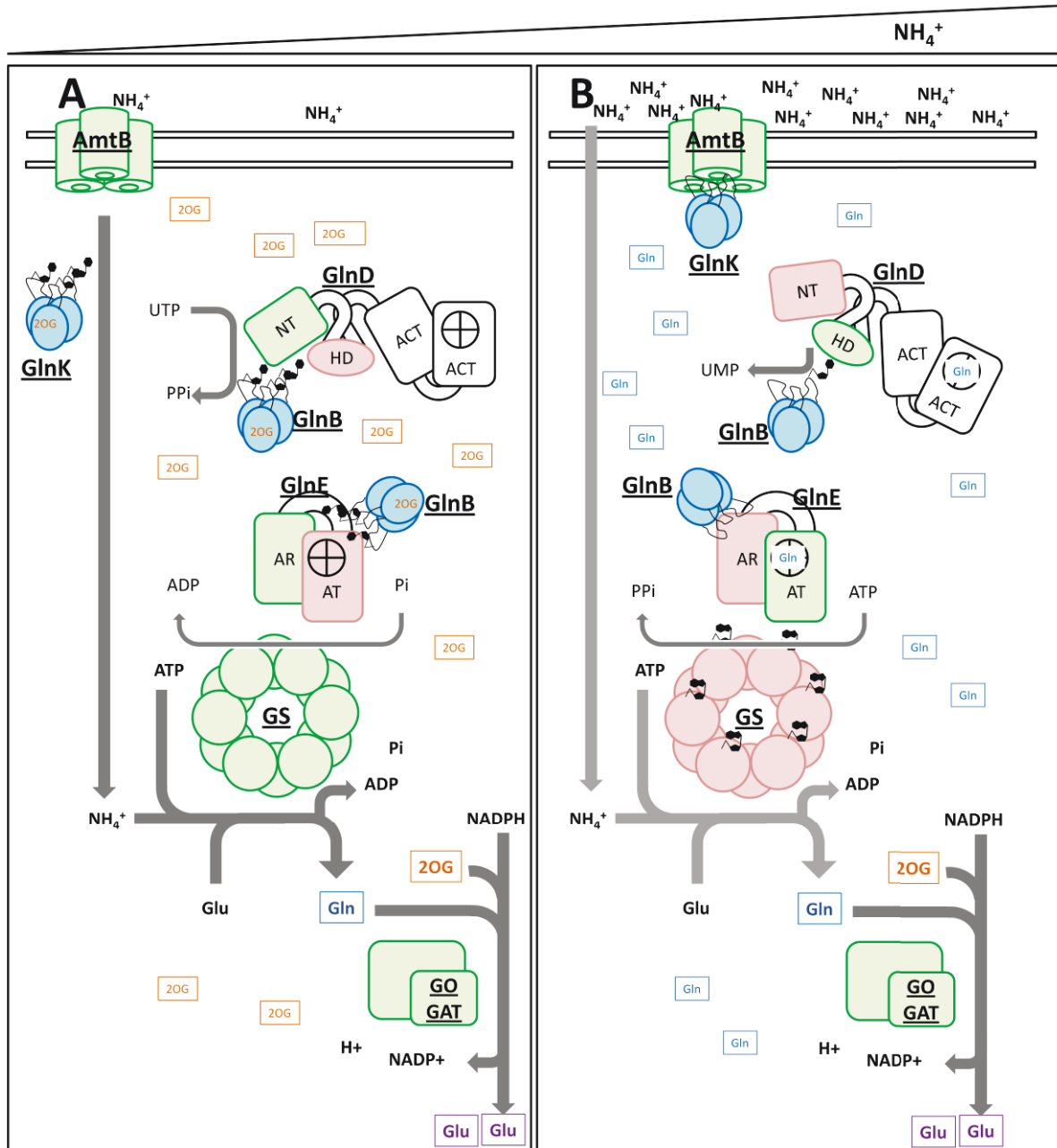


Figura 1 - Regulação da assimilação de amônio em *E. coli*.

(A) Quando a concentração de amônio (NH_4^+) extracelular é baixa, a concentração intracelular de 2-oxoglutarato (2OG) é elevada e a concentração intracelular de glutamina (Gln) é baixa. Nestas condições, GlnD catalisa a uridilação das proteínas PII, GlnB e GlnK. GlnK uridilada não consegue interagir com AmtB, o que permite o fluxo desimpedido de amônio através deste transportador passivo. GlnB uridilada encontra-se majoritariamente ligada a ATP e 2OG, e nestas condições interage com o domínio AT de GlnE, estimulando a atividade do domínio AR N-terminal, que catalisa a remoção dos grupos AMP da glutamina sintetase (GS). GS desadenilada é altamente ativa, e catalisa a adição de NH_4^+ a glutamato (Glu), formando glutamina ao custo de 1 ATP por molécula; a enzima GOGAT posteriormente transfere o grupo amino da cadeia lateral de glutamina para 2OG, sintetizando glutamato ao custo de 1 NADPH por molécula. (B), Quando a concentração de amônio extracelular é alta, a concentração intracelular de 2OG é baixa e a concentração intracelular de glutamina é elevada. O domínio ACT C-terminal de GlnD liga-se a glutamina, inibindo a atividade nucleotidiltransferase do domínio NT e estimulando a atividade de remoção do nucleotídeo do domínio HD. Isto leva à desuridilação das proteínas PII (GlnB e GlnK). GlnK desuridilada (e sem ligação a 2OG) interage com AmtB, bloqueando o canal de amônio – todo o amônio adquirido pela

célula passa a ser obtido por difusão de amônia (NH_3) através da membrana. GlnB desuridilada encontra-se majoritariamente ligada a ATP/ADP, mas não a 2OG; nestas condições, GlnB interage com o domínio AR de GlnE, estimulando a atividade do domínio AT C-terminal, que catalisa a adenililação de GS. GS adenililada é pouco ativa, de modo que a taxa de incorporação NH_4^+ diminui sensivelmente em relação à observada durante a escassez de amônio.

1.2.3. Alteração da expressão gênica em resposta aos níveis de amônio

Além da regulação pós-traducional da atividade das proteínas envolvidas na assimilação do amônio, há também controle da expressão gênica destas e de outras proteínas em resposta a variações na concentração de amônio, de modo a permitir um ajuste melhor do metabolismo a diferentes fontes de nitrogênio. Há mais variação entre os organismos neste aspecto da regulação da assimilação de amônio do que na regulação direta da atividade das proteínas da via, de modo que os dados encontrados em *E. coli* devem ser extrapolados com cautela para outros organismos. De modo geral, três proteínas, NtrB (NRII), NtrC (NRI) e o fator σ^{54} (NtrA, RpoN), estão indiretamente envolvidas com a regulação da assimilação de amônio ao controlar a expressão de alguns dos genes que codificam proteínas envolvidas neste processo.

Diversos genes do metabolismo de nitrogênio, especialmente no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio, são expressos sob o controle de um fator sigma específico, denominado σ^{54} (ou σ^N) (KUSTU *et al.*, 1989), constitutivamente expresso (CASTAÑO e BASTARRACHEA, 1984). O fator σ^{54} reconhece uma seqüência conservada nas regiões -24 e -12 dos promotores de seus genes alvo (TGGCACRNNNTTGCW em *E. coli* – BARRIOS *et al.*, 1999). Sua estrutura foi recentemente elucidada (CAMPBELL *et al.*, 2017).

Diferentemente dos demais fatores sigma de *E. coli*, que são intrinsecamente capazes de a transcrição gênica caso tenham a chance de interagir com a região promotora (DAVIS *et al.*, 2017), σ^{54} é intrinsecamente inativo; sua ligação à região promotora leva ao recrutamento da RNA polimerase, mas não ao início da transcrição (ZHANG e BUCK, 2015). A transcrição a partir de σ^{54} somente pode ser iniciada através da interação com uma *enhancer binding protein* bacteriana (bEBP), que cliva ATP para gerar a alteração conformacional em σ^{54} necessária para o início da transcrição (MORETT e SEGOVIA, 1993).

NtrB e NtrC são proteínas que formam um sistema de dois componentes (STOCK, ROBINSON, e GOUDREAU, 2000), no qual NtrB corresponde à proteína histidina-quinase sensora e NtrC à proteína de regulação de resposta. NtrB catalisa a fosforilação/defosforilação de NtrC, e NtrC fosforilado atua como um ativador transcricional (NINFA e MAGASANIK, 1983).

NtrC é um ativador transcricional da família das bEBPs, que possui uma arquitetura de três domínios bastante característica (SHINGLER, 1996): o domínio N-terminal possui

função regulatória, com um resíduo de aspartato (D54) que é alvo para a fosforilação por NtrB (SANDERS *et al.*, 1992). O domínio central pertence à família AAA+, e contém os motivos de Walker para ligação e hidrólise de ATP (HANSON e WHITEHEART, 2005), além de um motivo conservado GAFTGA de interação com o fator σ^{54} (WANG *et al.*, 1997). Por fim, o domínio C-terminal contém um motivo hélice-volta-hélice de interação com DNA (ARAVIND *et al.*, 2005), que permite a NtrC reconhecer regiões específicas das regiões promotoras de seus genes-alvo e é essencial para a dimerização de NtrC (KLOSE *et al.*, 1994).

NtrC não-fosforilado é mantido em sua forma inativa, dimérica, por seu domínio C-terminal. A fosforilação do resíduo D54 facilita a formação da forma ativa, hexamérica, de NtrC ligado às regiões promotoras de seus genes-alvo (PORTER *et al.*, 1993). O hexâmero de NtrC fosforilado interage com o fator σ^{54} através do motivo GAFTGA e cliva ATP a ADP e Pi, catalisando a formação do complexo aberto para iniciar a transcrição de genes dependentes de σ^{54} .

O estado de fosforilação de NtrC é controlado principalmente por NtrB, uma proteína com atividade de histidina quinase e fosfatase que é um dos alvos de regulação de GlnB. NtrB é uma proteína dimérica com massa total de 68 kDa que possui três domínios funcionais: um domínio N-terminal sensor, um domínio central H (helical) que contém um resíduo de histidina autofosforilável (NINFA *et al.*, 1993), e um domínio GHKL C-terminal responsável pela ligação a nucleotídeos (KRAMER e WEISS, 1999). NtrB possui atividade de quinase ATP-dependente e fosfatase reguladas pela interação da proteína GlnB com a região C-terminal de NtrB (PIOSZAK, JIANG, e NINFA, 2000). Na presença de amônio, GlnB desuridililada liga-se a três moléculas de ATP e uma de 2OG interage com NtrB, inibindo sua atividade de autoquinase e estimulando sua atividade de fosfatase, levando à desfosfatização de seu alvo NtrC (JIANG e NINFA, 1999)⁶. A interação entre GlnB e NtrB parece envolver o T-loop de GlnB (MARTINEZ-ARGUDO e CONTRERAS, 2002) e o domínio transmissor de sinal (H + GHKL) de NtrB (PIOSZAK, JIANG, e NINFA, 2000; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2002)⁷. Na ausência de amônio, porém, GlnB é uridililada por GlnD, o que a impede de interagir com NtrB; a ausência de interação com GlnB estimula a atividade de NtrB, que realiza sua autofosforilação e transferência do grupo fosfato para NtrC (ATKINSON *et al.*, 1994). Deste modo, NtrC é fosforilado quando a concentração intracelular de amônio for baixa (GlnB uridililada, incapaz de estimular a atividade fosfatase de NtrB).

⁶ De acordo com os mesmos autores, a ligação de GlnB a mais moléculas de 2OG torna-a menos eficiente em ativar a atividade de fosfatase de NtrB, muito embora GlnB permaneça associada a NtrB (JIANG e NINFA, 2009b).

⁷ O "domínio sensor" de NtrB parece não estar realmente envolvido com sensoreamento, mas sim com a dimerização de NtrB (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2001).

Um segundo doador de grupos fosfato para NtrC é o acetil fosfato, um metabólito que tende a acumular-se no citoplasma com o aumento da concentração de acetil-CoA e acetato, e cuja presença indica um ambiente com alta relação carbono / nitrogênio (McCLEARY e STOCK, 1994). Sua principal função sinalizadora parece ser de aumentar a intensidade da resposta de alguns sistemas de dois componentes, entre eles NtrB-NtrC (WOLFE, 2005).

O sistema NtrB-NtrC tem efeito indireto sobre a assimilação de amônio ao controlar a transcrição de algumas das proteínas envolvidas no processo. Em *E. coli*, o gene *glnA* é expresso a partir de dois promotores: o promotor distal (*glnAp1*) é dependente de σ^{70} , ativado por cAMP (REITZER e MAGASANIK, 1985) e reprimido por NtrC (HIRSCHMAN *et al.*, 1985); e um promotor proximal (*glnAp2*) fortemente induzido por σ^{54} e NtrC (REITZER e MAGASANIK, 1985), garantindo que a expressão de GS seja maior quando a concentração de amônio for baixa, situação em que NtrC está ativo. Dois sítios de ligação para NtrC ocorrem neste promotor: um parcialmente sobreposto à região -35 do promotor *glnAp1*, e outro sobreposto ao início da transcrição (REITZER e MAGASANIK, 1986). Além disso, os genes *ntrBC* (também denominados *glnLG*) localizam-se à jusante de *glnA* no mesmo operon, de modo que a expressão de GS mediada por NtrC também conduz à expressão de mais NtrC (REITZER e MAGASANIK, 1985). A região entre os genes *glnA* e *ntrBC* contém também um terceiro promotor σ^{70} exclusivo aos genes *ntrBC*, cuja atividade é negativamente regulada pela ligação de NtrC a um sítio sobreposto ao início da transcrição a partir de *glnAp1* (PAHEL, ROTHSTEIN e MAGASANIK, 1982; UENO-NISHIO *et al.*, 1984). Assim, em condições de excesso de amônio, NtrC desfosforilado reprime a transcrição tanto de *glnA* quanto de *ntrBC* ao ligar-se a seus sítios sobrepostos ao início da transcrição e região -35 de *glnAp1*; quando a concentração de amônio diminui, NtrC ligado aos dois sítios (mas especialmente ao sítio sobreposto a -35) ativa a transcrição de *glnAntrBC* (HUNT e MAGASANIK, 1985; REITZER e MAGASANIK, 1986). Em outras proteobactérias, a regulação da transcrição por este sistema de dois componentes é semelhante à de *E. coli*, com algumas exceções – os genes *glnA* e *ntrBC* nem sempre se encontram sob controle de um mesmo operon⁸.

O operon *glnKamtB* de *E. coli* é transcrito exclusivamente a partir de um promotor σ^{54} ativado pela ligação de NtrC fosforilado a um sítio (e meio) de ligação a NtrC (van HEESWIJK *et al.*, 1996, *apud* HERVÁS *et al.*, 2009; ATKINSON *et al.*, 2002), o que implica que a quantidade de canais de amônio na membrana será maior quando a célula estiver em

⁸ Por exemplo, os genes *glnA* e *ntrBC* não formam um mesmo operon em *A. brasilense* (LIANG, ARSENE e ELMERICH, 1993), *R. capsulatus* (JONES e HASELKORN, 1989) e *S. meliloti* (SZETO *et al.*, 1987). Em *K. pneumoniae*, o controle da transcrição de *glnAntrBC* é essencialmente idêntico ao de *E. coli*, com dois promotores *pglnA1* (σ^{70} , inibido por NtrC) e *pglnA2* (σ^{54} , ativado por NtrC) a montante de *glnA* e um terceiro promotor σ^{70} (inibido por NtrC) à montante de *ntrBC*, com um terminador rho-independente entre *glnA* - *ntrBC* (ALVAREZ-MORALES, DIXON e MERRICK, 1984; MacFARLANE e MERRICK, 1985). Em *H. seropedicae*, a transcrição de *glnAntrBC* é controlada por dois promotores tal como em *E. coli* (PERSUHN *et al.*, 2000).

ambiente com baixa concentração de amônio. Devido à coexpressão de GlnK, a concentração intracelular total de PII aumenta na ausência de amônio; isto pode ser fisiologicamente relevante, uma vez que, em *E. coli*, GlnB e GlnK podem formar heterotímeros e substituir uma à outra na interação com seus alvos (van HEESWIJK *et al.*, 2000). A transcrição de GlnB (LIU e MAGASANIK, 1993), GlnD (KIM *et al.*, 1998) e GlnE (van HEESWIJK *et al.*, 1993) é constitutiva, independente de σ^{54} e NtrC em *E. coli*.

A figura 2 resume as informações apresentadas nos parágrafos anteriores:

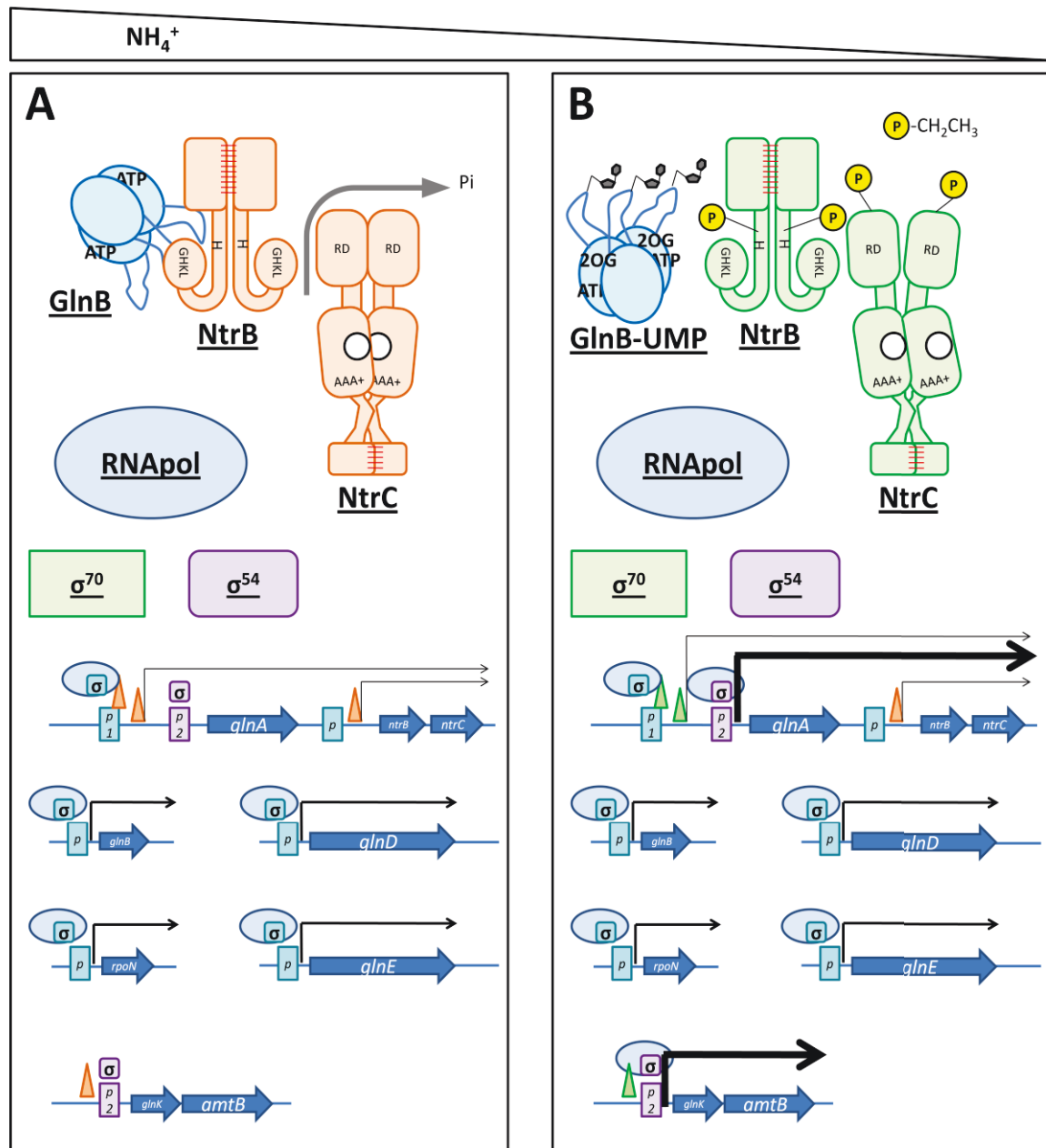


Figura 2 - Regulação da transcrição da assimilação do amônio em *E. coli*.

(A) Quando a concentração de amônio extracelular é alta, a concentração intracelular de 2OG é baixa e a concentração intracelular de glutamina é elevada. GlnB desuridilada e ligada a ATP e (no máximo) uma molécula de 2OG interage com o domínio quinásico (H + GHKL) de NtrB, inibindo sua atividade de fosfotransferase e estimulando sua atividade fosfatásica. Nesta condição, NtrC permanece em sua forma dimérica inativa, desfosforilada, e liga-se de maneira inibitória à região promotora de *glnAntrBC*, à região intergênica entre *glnA* e *ntrBC*, e à região promotora de *glnKamtB*. A transcrição de *glnA*, *ntrB*, e *ntrC* ocorre de forma atenuada a partir dos promotores σ^{70} . (B), Quando a concentração de amônio extracelular é baixa, a concentração intracelular de 2OG é elevada e a concentração intracelular de glutamina é baixa. GlnB encontra-se uridilada e ligada a ATP e 2OG, e nesta condição não interage com NtrB, o que estimula sua atividade quinásica e de fosfotransferase. NtrB (e, em menor grau, acetilfosfato) transfere grupamentos fosfato para o resíduo D54 de NtrC, tornando-a capaz de formar hexâmeros transcricionalmente ativo. NtrC fosforilado ativa a transcrição dependente de σ^{54} nos promotor *glnAp2* e *glnKamtB*. A transcrição de *glnB*, *glnD*, *glnE* e *rpoN* é constitutiva.

A regulação da expressão gênica por NtrC não se restringe aos promotores de *glnAntrBC* e *glnKamtB*; NtrC é um regulador geral do metabolismo em *E. coli*, com influência direta ou indireta sobre a expressão de cerca de 2% do genoma (ZIMMER *et al.*, 2000). No geral, os demais genes do regulon NtrC estão relacionados com a expressão de transportadores para fontes alternativas de nitrogênio.

1.2.4. Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*

As seções anteriores descreveram o metabolismo geral de assimilação do amônio e controle do metabolismo de nitrogênio de proteobactérias baseando-se principalmente no conhecimento que se tem deste sistema em *E. coli*; as características gerais do sistema tendem a ser conservadas nas proteobactérias, mas alguns pontos específicos, especialmente no que toca à regulação da expressão gênica, podem variar entre os organismos.

H. seropedicae possui um sistema de regulação do metabolismo de nitrogênio muito semelhante ao descrito para *E. coli*: o operon *glnAntrBC* é transcrito tanto a partir de um promotor constitutivo quanto de um promotor regulado por NtrC (PERSHUN *et al.*, 2000; SCHWAB *et al.*, 2007); duas proteínas PII estão presentes (BENELLI *et al.*, 2002), dentre as quais GlnB é expressa constitutivamente (BENELLI *et al.*, 1997) e GlnK é coexpressa com AmtB a partir de um promotor σ^{54} regulado por NtrC (NOINDORF *et al.*, 2005). Uma diferença para com *E. coli* é a presença de um gene adicional no operon *nlnAglnKamtB* de *H. seropedicae*; a função de *nlnA* permanece obscura (NOINDORF *et al.*, 2006).

Ambas as proteínas PII de *H. seropedicae* interagem com ATP, ADP e 2OG (OLIVEIRA *et al.*, 2015) e podem ser uridililadas por GlnD, com a uridililação requerendo 2OG e a desuridililação necessitando de glutamina (BONATTO *et al.*, 2007). GlnB, GlnK, e suas respectivas formas uridililadas ligam-se a ATP, ADP, e 2OG com cooperatividade homotrópica negativa e com cooperatividade positiva entre ATP e 2OG (OLIVEIRA *et al.*, 2015). O mesmo estudo mostrou que as proteínas PII de *H. seropedicae* têm afinidade mais baixa por ATP/ADP quando uridililadas, mas mantêm a mesma afinidade por 2OG – uma diferença em relação a GlnB de *E. coli*, que quando uridililada mantém a afinidade por ATP/ADP e perde afinidade por 2OG (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998). Há algumas diferenças quanto ao padrão de uridililação entre GlnB e GlnK em *H. seropedicae*: a uridililação de GlnB é afetada negativamente pelo aumento da concentração de ADP no sistema de reação, ao passo que a uridililação de GlnK é indiferente à presença de ADP (BONATTO *et al.*, 2012). Tanto GlnB quanto GlnK interagem com a proteína AmtB quando as células são submetidas a um choque de amônio (HUERGO *et al.*, 2010).

Algumas diferenças fundamentais entre a regulação do metabolismo de nitrogênio em *H. seropedicae* e *E. coli* são devidas à presença de genes adicionais em *H. seropedicae*

para a aquisição de nitrogênio de fontes alternativas, como nitrato (através de nitrato redutase assimilatória – BONATO *et al.*, 2016) e o nitrogênio atmosférico (através do sistema de fixação biológica de nitrogênio – ver CHUBATSU *et al.*, 2012, e seção 1.4), e de seus respectivos reguladores. Além do sistema de dois componentes NtrB/NtrC, *H. seropedicae* também possui um sistema de regulação NtrX/NtrY, que está envolvido na expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrato na ausência de amônio (BONATO *et al.*, 2016). O próprio regulon de NtrC inclui alguns genes diferentes em *H. seropedicae*; notoriamente, entre seus membros está o ativador transcricional NifA, responsável pela ativação da transcrição dos genes de fixação de nitrogênio (WASSEM *et al.*, 2002). NtrC também foi recentemente associado com a expressão de glucose-6-fosfato desidrogenase em *H. seropedicae*, evidenciando uma conexão entre o metabolismo de carbono e o de nitrogênio (SACOMBOIO *et al.*, 2017).

As enzimas GS, GOGAT, GDH de *H. seropedicae* não foram estudadas. O gene *glnE* está presente, e sua interrupção leva a uma menor eficiência na incorporação de nitrogênio atmosférico (FAORO, 2004). Regulação da expressão de GlnD e GlnE não foi estudada neste organismo.

1.3. PROTEÍNAS PII

Em todo o processo de regulação do metabolismo de nitrogênio em procariotos, as proteínas da família PII possuem importância central. Proteínas da família PII são ubiquamente distribuídas em Bacteria, Archaea, e Plantae; a análise filogenética de mais de 700 seqüências permitiu dividi-las em três subfamílias (SANT'ANNA *et al.*, 2009): uma contendo os genes *glnB/glnK*, mais conhecidos e estudados; outra contendo *nif1* e *nif2*, proteínas PII associadas aos operons de fixação de nitrogênio (LEIGH e DODSWORTH, 2007); e uma terceira contendo proteínas pouco caracterizadas, aparentemente associadas com transportadores de metais. De maior interesse, para este trabalho, são as proteínas denominadas GlnB e GlnK.

Seguindo-se a proposta de Arcondeguy, Jack e Merrick (2001), reforçada pelo conhecimento de filogenia (SANT'ANNA *et al.*, 2009), denomina-se *glnB* os genes de PII associados a *glnA* ou *nadE* e *glnK* os genes associados a *amtB*, ou ao menos filogeneticamente mais próximos dos demais genes *glnK* do que dos genes *glnB*. O gene *glnZ* de *A. brasilense* mantém o nome por tradição (foi descoberto e nomeado na mesma época que *glnK* – de ZAMAROCZY *et al.*, 1996) e por não ser cotranscrito juntamente com *amtB*, embora seja semelhante aos demais genes *glnK* em termos de seqüência e função e interaja com AmtB (RAJENDRAN *et al.*, 2011). Para organismos que possuem mais de dois genes PII parálogos, utiliza-se letras adicionais além de *glnB* e *glnK* (*Rhodospirillum rubrum* possui GlnB, GlnK, e GlnJ, por exemplo – JONSSON *et al.*, 2007). Parálogos de PII podem

apresentar grande semelhança funcional (NOINDORF *et al.*, 2011) ou grandes divergências (TEIXEIRA *et al.*, 2008a), dependendo do organismo em estudo.

A relevância das proteínas PII para o metabolismo provém de sua capacidade de regular a atividade de proteínas alvo por meio de interações proteína-proteína, que por sua vez são reguladas pela conformação adotada por PII em razão de sua interação com micromoléculas sinalizadoras e/ou de sua modificação pós-traducional (HUERGO, CHANDRA, e MERRICK, 2013).

Em bactérias e arqueias, a função principal de PII é regular a atividade de proteínas envolvidas com o metabolismo central de nitrogênio (ARCONDEGUY, JACK, e MERRICK, 2001), ao passo que em plantas a principal função descrita para as proteínas PII é a regulação da síntese de arginina no cloroplasto, através de interação com a enzima NAGK (UHRIG *et al.*, 2009). Uma conexão entre PII e o metabolismo de carbono foi estabelecida em *E. coli* com a caracterização da interação entre GlnB e BCCP (GERHARDT *et al.*, 2015). As proteínas PII apresentam uma notável similaridade de seqüência e estrutura (HUERGO, CHANDRA, e MERRICK, 2013); PII são proteínas triméricas pequenas (em Proteobacteria, com raras exceções, estas proteínas possuem 112 resíduos) que apresentam três sítios para a ligação de micromoléculas nas interfaces entre os monômeros. A estrutura geral de PII é descrita como um barril de α -hélice/folha β contendo três regiões pouco estruturadas com grande importância funcional: o T-loop, o B-loop e o C-loop. O T-loop é uma região grande (10-12 resíduos) altamente flexível e com pouca estruturação secundária que se sabe estar envolvido na interação com a maioria dos alvos já caracterizados das proteínas PII. À exceção da proteína DraG de *A. brasilense*, que interage com a face lateral do trímero de GlnZ (RAJENDRAN *et al.*, 2011), as demais interações já caracterizadas entre proteínas PII e seus alvos (GlnK e AmtB (CONROY *et al.*, 2007), GlnB e NtrB (JIANG e NINFA, 1999), PII e NAGK (LLACER *et al.*, 2007), PII e PipX (LLACER *et al.*, 2010), e diversas PII e proteínas NifA (ver seção 1.4.2)) têm envolvimento crucial do T-loop. O T-loop é também uma região importante para a regulação da atividade de PII, pois contém resíduos que podem sofrer modificação pós traducional (MERRICK, 2015). A modificação é geralmente uridililação do resíduo Y51 em proteobactérias, adenililação do resíduo Y51 em *Streptomyces coelicolor* (HESKETH *et al.*, 2002) e *Corynebacterium glutamicum* (STROSSER *et al.*, 2004), e fosforilação do resíduo S49 em cianobactérias (FORCHHAMMER *et al.*, 2004). A modificação pós-traducional é importante para modular a interação com diversas proteínas alvo. O B-loop e o C-loop estão envolvidos na formação de sítios para interação com micromoléculas (ATP, ADP, 2OG) nas interfaces entre os monômeros de PII. A figura 3 mostra a estrutura de GlnZ de *A. brasilense*, a primeira proteína PII cristalizada com 2OG e ATP no sítio de interação correto (PDB 3MHY – TRUAN

et al., 2010), como exemplo de estrutura de PII, destacando as regiões mais bem caracterizadas.

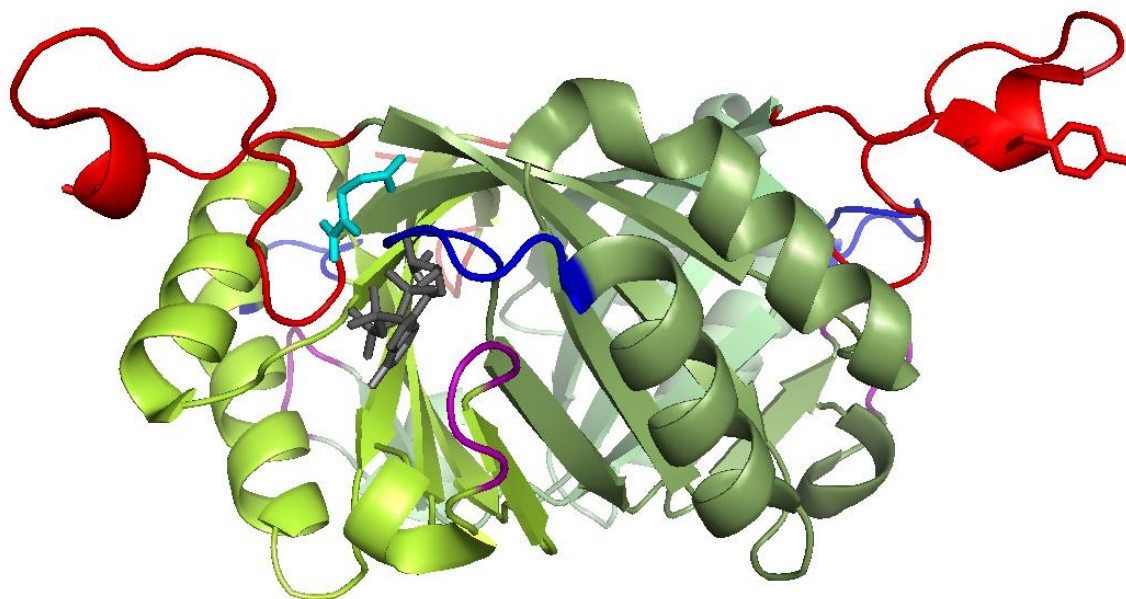


Figura 3 - Vista lateral do trímero de GlnZ de *A. brasilense* (PDB 3MHY).

Cada monômero está representado em diferentes tons de verde. Os efetores 2OG (ciano) e ATP (cinza) estão destacados em um dos sítios de interação com efetores presente na interface entre duas subunidades. Formando parte do sítio de interação com efetores estão o B-loop (82-88, em azul) e o C-loop (102-105, em roxo). O T-loop (37-55) está mostrado em vermelho, com o resíduo de tirosina 51 que é alvo de uridilação em proteobactérias representado com sua cadeia lateral.

A interface entre os monômeros de PII abriga sítios de ligação com alta afinidade por ATP/ADP e 2OG. O padrão geral é bastante semelhante entre os organismos estudados: ATP e ADP ligam-se competitivamente à mesma região do sítio de interação com efetores, e a interação de PII com 2OG depende da presença de ATP e aumenta a afinidade de PII por ATP (sinergia entre ATP e 2OG). ADP, por sua vez, antagoniza a interação de PII com ATP (FORCHHAMMER e LUDDECKE, 2015). Cada trímero de PII tem potencial para ligar-se a até 3 moléculas de ADP, ou até 3 moléculas de ATP, ou a 3 moléculas de ATP e até 3 de 2-oxoglutarato, abrindo a possibilidade de padrões de regulação complexos dependentes da interação com diferentes quantidades de cada efector. Ainda, a ligação de PII a efetores frequentemente apresenta cooperatividade homotrópica negativa entre os três sítios, implicando na existência de três constantes de dissociação diferentes e três conformações distintas para cada efector (FOKINA *et al.*, 2010). Os diversos estados possíveis de ligação de GlnB de *E. coli* foram alvo de tratamento matemático recentemente (ROCHA *et al.*, 2013). Devido à alta afinidade da maioria das proteínas PII por ATP/ADP (em GlnB de *E. coli*, Kd entre 50-520 μ M para a ligação a ATP na ausência de 2OG, e Kd de 32-38 μ M para a ligação de ADP – JIANG e NINFA, 2007b), e à elevada concentração destes metabólitos nas células (3 mM de ATP, 250 μ M de ADP –

BUCKSTEIN, HE e RUBIN, 2008 – com pouca alteração na presença ou ausência de amônio – YUAN *et al.*, 2009), é esperado que PII esteja sempre ligada a adenonucleotídeos *in vivo*. Quando as células são cultivadas na presença de fonte abundante de energia (como nos estudos citados), espera-se que a maior parte das proteínas PII encontre-se ligada a três moléculas de ATP, com uma pequena subpopulação ligada a 2 ATP e 1 ADP; ligação a duas ou mais moléculas de ADP só é esperada na ausência de fontes de energia – ou, possivelmente, caso as proteínas PII possuam atividade ATPásica, uma proposta ainda controversa (RADCHENKO, THORNTON e MERRICK, 2013).

Diferentemente da concentração de adenilatos, a concentração de 2OG é altamente variável (0,4-10 mM – YUAN *et al.*, 2009) de acordo com a disponibilidade de amônio na célula (HUERGO e DIXON, 2015), e portanto há possibilidade de encontrar PII ligada a uma, duas, ou três moléculas de 2OG (o Kd da interação de GlnB de *E. coli* com 2OG é de 12, 120, e 5000 μ M para um, dois e três sítios ocupados – JIANG e NINFA, 2007b. Na ausência de ATP, o Kd de 2OG foi estimado em 4 mM, fisiologicamente irrelevante – ENGLEMAN e FRANCIS, 1978). A interação de PII com seus efetores influencia sua conformação, e a conformação de PII, por sua vez, influencia sua capacidade de interagir com seus alvos e os efeitos de seu modo de interação. A figura 4 representa todos os estados possíveis de ligação de PII desuridililada a ATP, ADP, e 2OG.

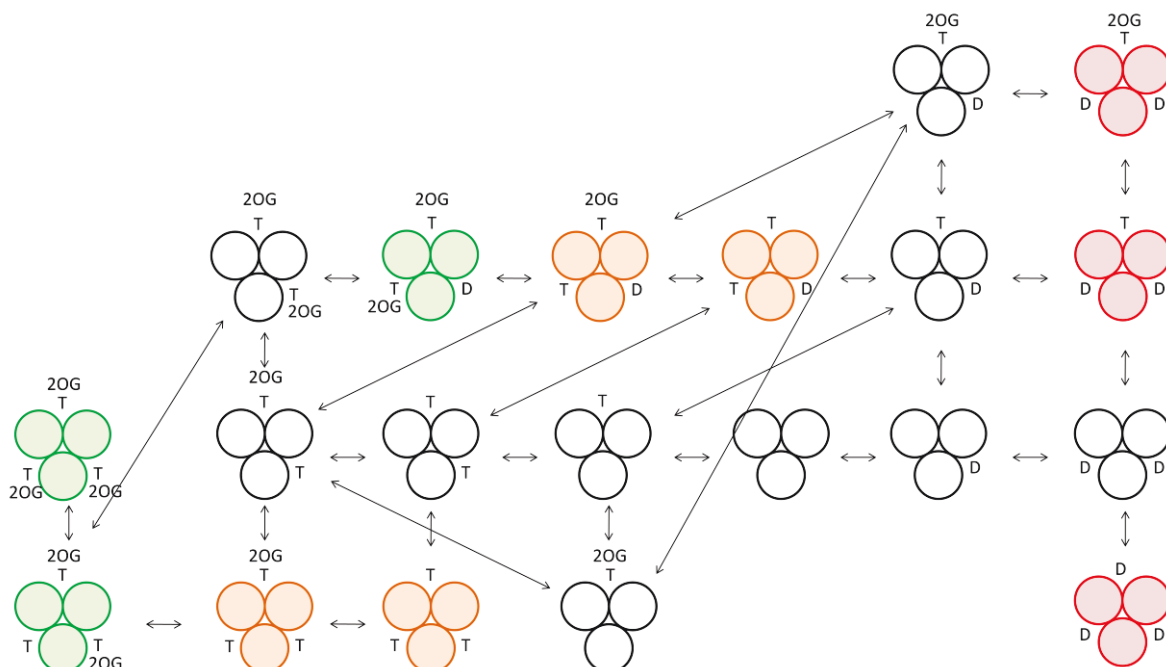


Figura 4 - Ligação de ATP, ADP, e 2OG a PII desuridililada.

O trímero de PII possui três sítios para a interação com micromoléculas localizados nas interfaces entre os monômeros. ATP e ADP competem pelos mesmos três sítios de ligação em PII, ao passo que 2OG pode ligar-se a um sítio somente quando este estiver ocupado por ATP. Todas as formas possíveis de ocupação/desocupação sequencial dos sítios de PII desuridililada encontram-se representadas. **T**, ATP; **D**, ADP, **2OG**, 2-oxoglutarato. Formas marcadas em **verde** predominam na ausência de amônio (alta concentração de 2OG), formas em **laranja** são mais comuns na presença de amônio (baixa concentração de 2OG), e as formas em **vermelho** só se espera observar durante severa carência de fontes de energia. As demais formas (que possuem ao menos um sítio de ligação a ATP/ADP desocupado) são estados de transição que não devem estar presentes em grande concentração na célula. A ligação de ADP a GlnB de *E. coli* ocorre com alta afinidade ($K_d = 32\text{-}38\ \mu\text{M}$) sem cooperatividade; a ligação a ATP possui cooperatividade negativa ($K_d = 50, 250, 520\ \mu\text{M}$ na ausência de 2OG; $0,36, 30, 300\ \mu\text{M}$ na presença de $2\ \text{mM}$ 2OG), tal como a ligação a 2OG ($K_d = 12, 120, 5000\ \mu\text{M}$ na presença de $4\ \text{mM}$ ATP). Os dados são de Jiang e Ninf (2007b).

Como já mencionado, as proteínas PII de proteobactérias também podem ser uridililadas/desuridililadas no resíduo de tirosina 51 (localizado no T-loop) pela proteína GlnD em resposta à concentração de glutamina (ver seção 1.2.2). A uridililação de PII em *E. coli* depende da presença de 2OG, com metade da uridililação máxima ocorrendo com $[2\text{OG}] \sim 5\ \mu\text{M}$ (KAMBEROV, ATKINSON e NINFA, 1995) – consistente com a necessidade de ocupação de ao menos um sítio de ligação a efetores. A presença de ATP também é essencial; no entanto, visto que quantidades muito pequenas de ATP ($20\ \mu\text{M}$) para que se detecte uridililação de PII (BROWN, SEGAL e STADTMAN, 1971), é bastante possível que a ocupação de apenas um sítio por ATP e 2OG já baste para a reação de uridililação. A exata extensão da uridililação na presença de quantidades limitantes de ATP ou 2OG (ou seja, se apenas uma, ou duas, ou três monômeros de PII podem ser modificados caso apenas um sítio de PII esteja ocupado por ATP e 2OG) não foi plenamente caracterizada; supõe-se que não possa haver uridililação total destas formas. A desuridililação parece depender

exclusivamente do aumento da concentração de glutamina, sendo indiferente à concentração de 2OG (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998; ZHANG *et al.*, 2010). Além de influenciar a interação de PII com diversas proteínas alvo, é bastante possível que a uridililação influencie a afinidade de PII por seus efetores ATP, ADP, e 2OG. Esta possibilidade não foi estudada a fundo em *E. coli*, mas um trabalho com PII de *H. seropedicae* (GlnB e GlnK) mostrou que, neste organismo, a uridililação diminuiu sensivelmente a afinidade de GlnB e GlnK por ATP e ADP (mas não por 2OG na presença de ATP saturante – OLIVEIRA *et al.*, 2015). Os estados de uridilação de PII fisiologicamente relevantes são mostrados na figura 5.

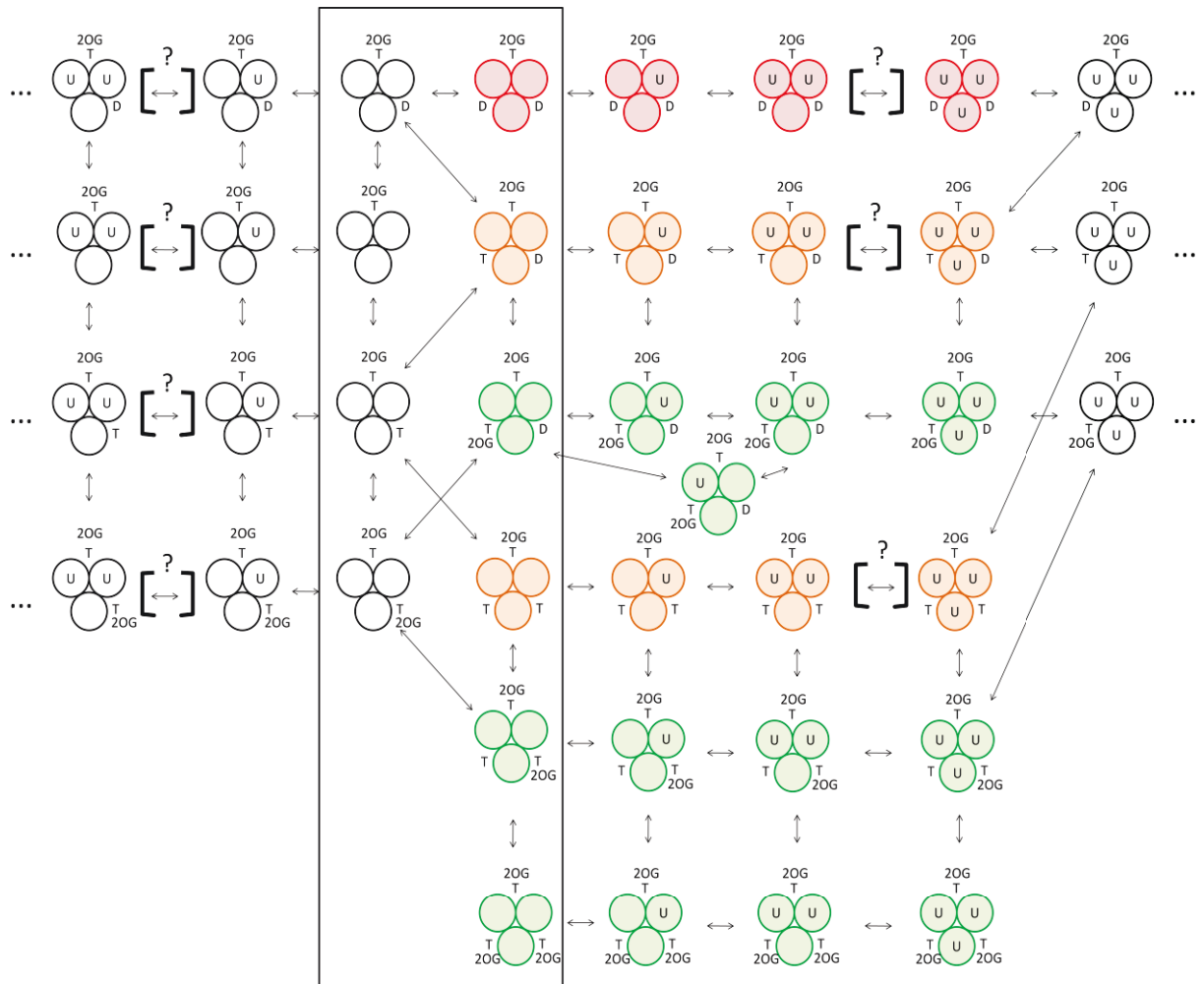


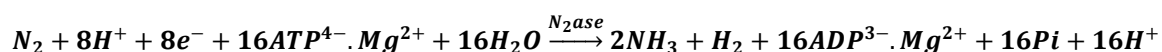
Figura 5 - Representação esquemática da uridililação sequencial de PII em proteobactérias.

Cada monômero de PII pode receber um grupo uridilil em seu resíduo de tirosina 51, com um máximo de três grupos uridilil por trímero. Segundo o modelo corrente, apenas formas de PII ligadas a pelo menos uma molécula de ATP e uma molécula de 2OG podem ser alvo da adição de uridilil (ver texto acima); estas dez formas (seis das quais são fisiologicamente relevantes) estão contidas dentro do retângulo preto. **T**, ATP; **D**, ADP, **2OG**, 2-oxoglutarato, **U**, uridilil. A transição entre as formas está marcada com uma seta simples; nos casos em que a possibilidade de transição ainda é duvidosa, marcou-se a seta com um ponto de interrogação e parênteses. Formas marcadas em **verde** predominam na ausência de amônio (alta concentração de 2OG), formas em **laranja** são mais comuns na presença de amônio (baixa concentração de 2OG), e as formas em **vermelho** só se observam durante severa carência de fontes de energia. As demais formas (que possuem ao menos um sítio de ligação a ATP/ADP desocupado) são estados de transição que não devem estar presentes em grande concentração na célula. É teoricamente possível obter formas uridililadas de PII ligadas somente a ATP ou a ADP (e não a 2OG) através da dissociação de 2OG posterior à uridililação e anterior à desuridililação estimulada pelo aumento da concentração intracelular de glutamina; não é claro se isto ocorre *in vivo*.

1.4. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) consiste na redução do gás dinitrogênio a amônio catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase. A FBN é responsável por cerca de 50-60% de todo o nitrogênio fixado anualmente na Terra (KIM e REES, 1994; VITOUSEK *et al.*, 1997, FOWLER *et al.*, 2013)⁹, sendo um processo vital para a manutenção do ciclo do nitrogênio. Este processo também é importante economicamente: visto que o nitrogênio é um dos principais nutrientes limitantes da produtividade agrícola (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2010). Desde a invenção da síntese de Haber-Bosch em 1909, a deficiência de nitrogênio no solo costuma ser corrigida com a adição direta de amônio sintetizado quimicamente – uma prática com custos econômicos e ambientais consideráveis (GILLER e CADISH, 1995; CREWS e PEOPLES, 2004).

O nitrogênio atmosférico é uma das fontes de nitrogênio alternativas ao amônio, e apresenta a vantagem de estar disponível em quantidade elevada, constante e inexaurível na atmosfera (78%). A capacidade de incorporá-lo a moléculas orgânicas, porém, está restrita aos poucos organismos procarióticos (denominados diazotrofos) que possuem o arcabouço enzimático para realizar a redução de N₂ a amônio. A baixa reatividade do dinitrogênio constitui o maior obstáculo para sua utilização (KIM e REES, 1994); a quebra da tripla ligação requer alto dispêndio de energia e um aparato molecular complexo. A estequiometria da reação foi definida a partir do trabalho de Simpson e Burris (1984), e é mostrada abaixo¹⁰:



A reação possui um custo energético elevado, com 8 ATP e 4 equivalentes redutores consumidos para cada átomo de nitrogênio fixado. A produção de gás hidrogênio é inerente ao mecanismo da reação (LUKOYANOV *et al.*, 2016) e seu potencial para a produção de biocombustíveis tem sido alvo de investigação (ADESSI *et al.*, 2012). A amônia produzida é rapidamente protonada a amônio em solução.

A reação envolve duas enzimas distintas, produto de três genes, que foram mais bem caracterizadas em *A. vinelandii*, o organismo modelo para estudo da nitrogenase. A proteína ferro (Fe, NifH, dinitrogenase redutase) é um homodímero de cerca de 40 kDa que contém dois sítios para ligação de ATP (um em cada monômero) e um cluster [4Fe-4S] na interface entre suas duas subunidades (GEORGIADIS *et al.*, 1992). Sua função é transferir

⁹ Do total de nitrogênio fixado biologicamente, Fowler e colaboradores (2013) estimaram que cerca de 23% (ou 50% da FBN terrestre) advenha de culturas vegetais.

¹⁰ Esta equação não aparece em Simpson e Burris (1984), embora seja decorrente diretamente deste trabalho e a maioria das revisões lhe façam referência direta (por exemplo, KIM e REES, 1994); para uma discussão maior sobre a representação completa desta reação, mostrada no texto, ver Ipata e Pesi (2015).

elétrons para reduzir a proteína ferro-molibdênio (FeMo, NifDK, dinitrogenase), que contém um complexo cofator de ferro-molibdênio (FeMoco, cluster M, [8Fe-9S-C-Mo-homocitrato]) pertencente ao sítio ativo da nitrogenase¹¹. A enzima que efetivamente catalisa a redução do nitrogênio é a proteína FeMo, um tetrâmero de ~250 kDa formado pela junção de dois de heterodímeros de NifDK. Cada heterodímero coordena dois centros metálicos: um cluster P (8Fe-7S – CHAN *et al.*, 1993), responsável por receber o elétron transmitido por NifH, e um cluster M (7Fe-9S-C-Mo-homocitrato – LANCASTER *et al.*, 2011), responsável pela catálise. As duas unidades do tetrâmero não funcionam independentemente; há cooperatividade negativa entre elas, de modo que um dímero de NifDK é inibido enquanto o outro está ativo (DANYAL *et al.*, 2016). Ambas as proteínas tiveram suas estruturas determinadas (GEORGIADIS *et al.*, 1992; TEZCAN *et al.*, 2005), e uma representação esquemática da interação entre as proteínas Fe e FeMo é mostrada na figura 6.

¹¹ Esta seção descreve apenas a nitrogenase dependente de molibdênio, que é a forma mais eficiente, melhor caracterizada e mais amplamente distribuída da nitrogenase. Diversos organismos codificam também nitrogenases alternativas estruturalmente semelhantes, que diferem da nitrogenase clássica pela presença de vanádio ou ferro no lugar do átomo de molibdênio no cluster M, o que torna a catálise menos eficiente. Entre estes organismos encontram-se *A. vinelandii* (HALES *et al.*, 1986; CHISNELL *et al.*, 1988), *R. rubrum* (LEHMAN e ROBERTS, 1991), *R. capsulatus* (MASEPOHL e KLIPP, 1996), *Rhodopseudomonas palustris* (ODA *et al.*, 2005), e *Anabaena variabilis* (THIEL, 1993).

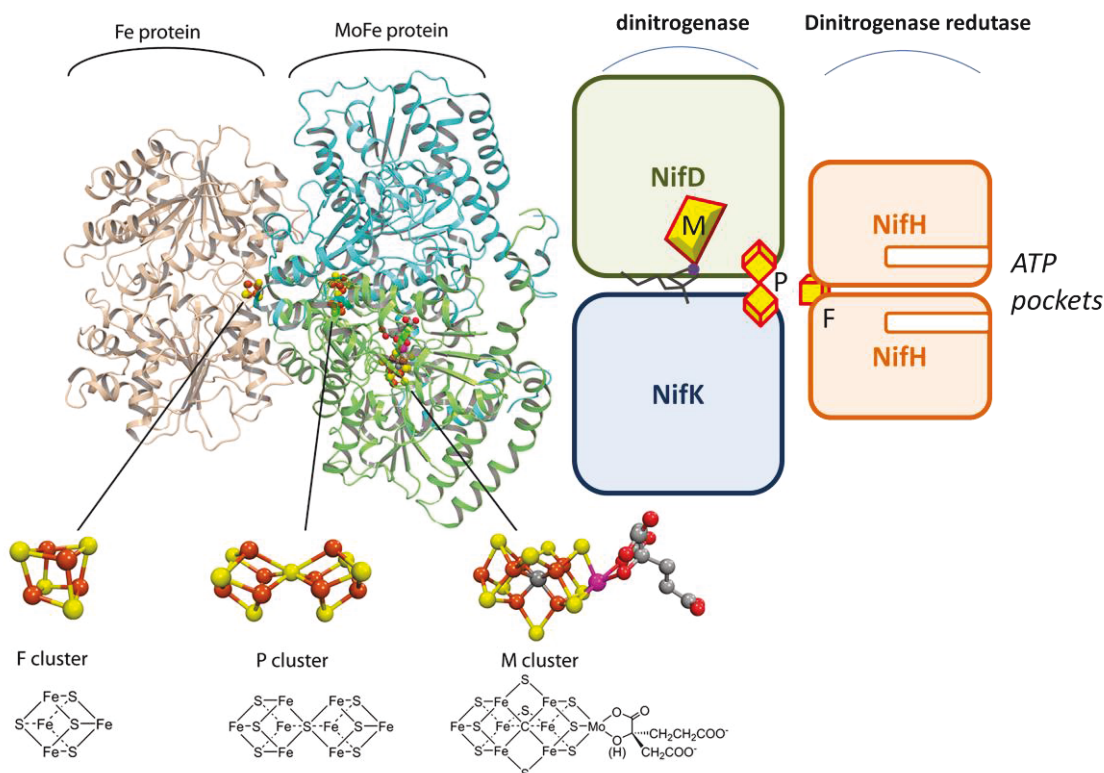


Figura 6 - Representação das proteínas Fe e FeMo que compõe a nitrogenase.

Metade do heterooctâmero formado durante a interação entre as proteínas Fe (NifH) e FeMo (NifDK) está representada como um modelo de estrutura secundária (à esquerda, PDB:4WZB), e a outra metade como um modelo esquemático para destacar as regiões mais importantes de cada proteína (à direita). Os dímeros de NifH estão coloridos em laranja, e encontram-se na periferia do complexo enzimático. Cada dímero de NifH possui um cluster F ([4Fe-4S]) na interface entre os monômeros (representado por um cubo amarelo), e é a face de NifH que contém o cluster F que interage com a proteína FeMo. Cada monômero de NifH contém um sítio para ligação de ATP localizado na face oposta à que interage com FeMo. A proteína FeMo é um tetrâmero formado por dois heterodímeros de NifDK (NifD em verde, NifK em azul), cada heterodímero contendo um cluster P ([8Fe-7S], representado dois cubos amarelos conectados) e um cluster M ([7Fe-9S-C-Mo-homocitrato], representado por um trapézio amarelo). Os clusters P localizam-se próximos da superfície de interação com NifH; cada tetrâmero de NifDK pode interagir com dois dímeros de NifH em faces opostas, embora a interação/redução seja anticooperativa entre as duas metades do tetrâmero (ver texto). Os elétrons fluem do cluster F de NifH para o cluster P de NifDK, e do cluster P para o cluster M que contém o sítio catalítico. Figura adaptada de HOFFMAN *et al.*, 2014.

A proteína Fe adquire elétrons de flavodoxina ou ferredoxina (MARTIN *et al.*, 1989), e portanto indiretamente de NADPH e piruvato (BLASCHKOWSKI *et al.*, 1982; BOTHE e FALKENBERG, 1972), e transfere-os um por um para a proteína dinitrogenase ao longo de 8 ciclos de associação/dissociação para catalisar a redução de uma molécula de dinitrogênio, ao custo de hidrólise de 2 moléculas de ATP por ciclo (SEEFELDT, HOFFMAN, e DEAN, 2009).

Cada ciclo da proteína Fe inicia-se com a ligação de duas moléculas de ATP à proteína Fe reduzida, que então interage com a proteína FeMo. A interação entre as duas proteínas leva quase imediatamente à transferência de um elétron do cluster [4Fe-4S] da

proteína Fe para o cluster P da proteína FeMo, reduzindo-a (DUVAL *et al.*, 2013). A proteína Fe oxidada então hidrolisa as duas moléculas de ATP produzindo ADP e Pi, que dissociam-se muito lentamente dos sítios de ligação ($16\text{-}25\text{ s}^{-1}$) (YANG *et al.*, 2016). Após a dissociação de Pi e ADP, a proteína Fe dissocia-se rapidamente de FeMo, e o ciclo recomeça com a redução da proteína Fe por flavodoxina ou ferredoxina (DUVAL *et al.*, 2013). A lenta etapa de dissociação de Pi do sítio catalítico da proteína Fe é a etapa limitante da reação de fixação do nitrogênio (YANG *et al.*, 2016).

Grandes avanços ocorreram recentemente na compreensão do mecanismo da redução do nitrogênio (HOFFMAN *et al.*, 2014; KHADKA *et al.*, 2017), especialmente no tocante ao papel da produção de hidrogênio. Thorneley e Lowe (1985) descreveram o ciclo de fixação de nitrogênio na forma de 9 etapas (E_0 a E_8), correspondentes ao número de elétrons transferidos para a proteína FeMo; estudos posteriores mostraram que a proteína FeMo pode acumular até 4 elétrons de cada vez, e portanto o ciclo pode ser dividido em duas metades (HOFFMAN *et al.*, 2014). A primeira metade do ciclo (E_0 - E_4) introduz progressivamente quatro elétrons e quatro átomos de hidrogênio (dois hidretos, dois prótons) ao cluster M, possivelmente com dois dos hidretos compartilhando parcialmente um mesmo átomo de ferro ligado a um enxofre ligado a molibdênio (LUKOYANOV *et al.*, 2010). Neste estado, dois átomos de hidrogênio e dois elétrons são combinados para formar gás hidrogênio, e H_2 pode ser liberado para que ocorra a ligação do substrato N_2 ao átomo de ferro mais reduzido do cluster FeMo (HOFFMAN *et al.*, 2014). As quatro etapas seguintes consistem na redução progressiva de N_2 a diazeno (N_2H_2), hidrazina (N_2H_4), e por fim a duas moléculas de amônio, liberadas nas etapas finais (E_7 - E_8) (HOFFMAN *et al.*, 2014). Os ciclos da proteína Fe e da proteína FeMo estão representados na figura 7.

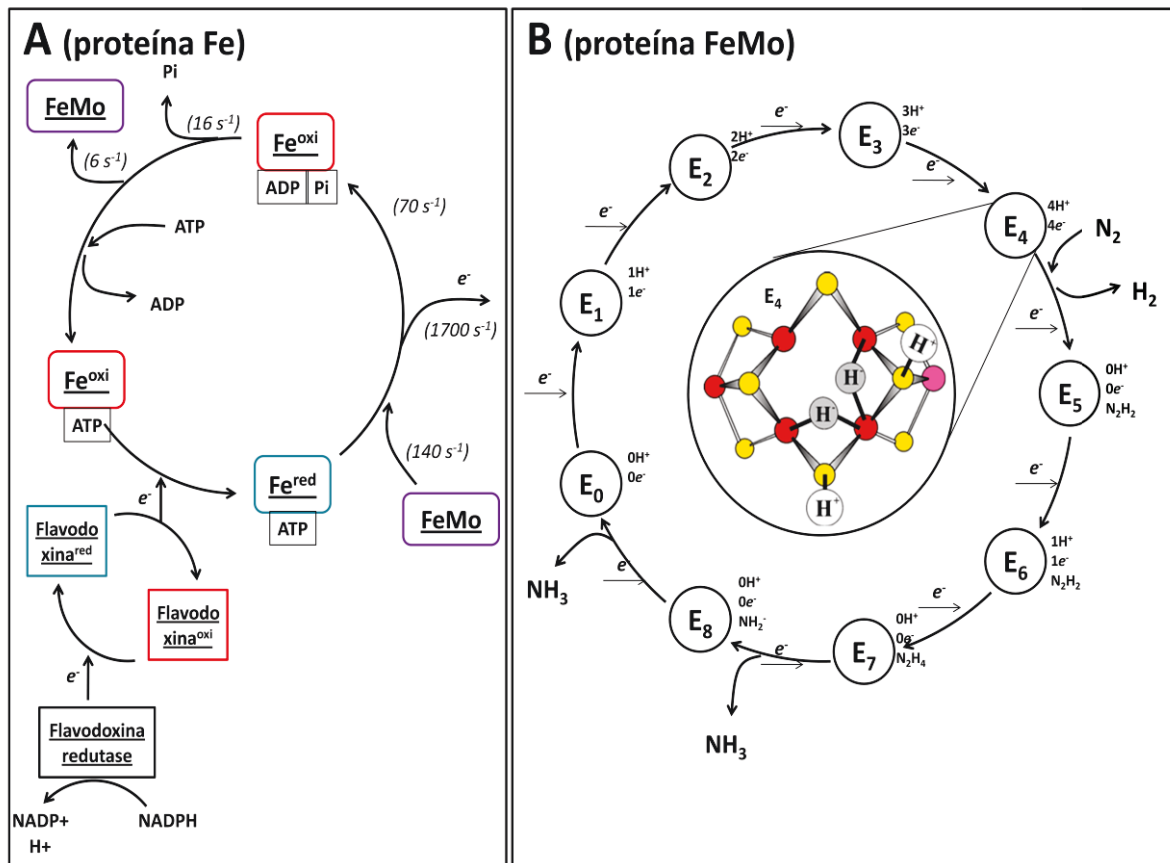


Figura 7 - Ciclos de redução das proteínas Fe e FeMo.

Esquema adaptado de SEEFELDT *et al.*, 2009. Constantes de primeira ordem para as etapas do ciclo da proteína Fe retirados de DUVAL *et al.*, 2013. Figura do cluster M no estágio E_4 retirada de HOFFMAN *et al.*, 2014. **(A)**, ciclo da proteína Fe. A proteína Fe possui um ciclo de oxi-redução ao longo do qual transfere um elétron para a proteína FeMo. O ciclo inicia-se com a proteína Fe oxidada e ligada a ATP recebendo um elétron de uma flavodoxina, reduzindo-se; a flavodoxina oxidada é reduzida novamente pela flavodoxina redutase ao custo de NADPH , deixando-a pronta para o próximo ciclo. A proteína Fe reduzida interage com a proteína FeMo e rapidamente transfere um elétron do cluster F para o cluster P (taxa de 1700 s^{-1}). Após a redução do cluster P, a proteína Fe oxidada cliva ATP a ADP e Pi (70 s^{-1}), e o fosfato produzido dissocia-se lentamente (16 s^{-1}) do sítio de ligação. Após a dissociação do fosfato, a proteína Fe dissocia-se ainda mais lentamente da proteína FeMo (6 s^{-1}); estas duas etapas são limitantes para a taxa de fixação de nitrogênio. Uma vez dissociada, a proteína Fe troca ADP por ATP e reinicia o ciclo. **(B)**, ciclo da proteína FeMo. O ciclo consiste de nove estágios (E_0 a E_8) cuja transição ocorre através da adição de um elétron vindo da proteína Fe, findos os quais a proteína FeMo libera uma molécula de hidrogênio gasoso e duas de amônia. Entre os estágios E_0 e E_4 , o cluster M acumula 4 elétrons e quatro prótons, provavelmente na disposição mostrada na figura ao centro do ciclo (vermelho representa átomos de ferro, amarelo de enxofre, rosa de molibdênio). No estágio E_4 , o cluster M (fortemente reduzido) pode adquirir seu substrato N_2 e reduzi-lo a diazeno (N_2H_2); a ligação/redução de N_2 desencadeia a formação de H_2 , que é liberado imediatamente, oxidando o cluster M. Nas etapas seguintes (E_5 a E_8), a adição de elétrons vindos da proteína Fe ocasiona a redução de diazeno a hidrazina (N_2H_4) e finalmente a duas moléculas de amônia (NH_3), que são liberadas na transição entre os estágios E_7 - E_8 e E_8 - E_0 .

A fixação de nitrogênio é bastante custosa para a célula: 8 ATP e 4 equivalentes redutores devem ser consumidos para cada molécula de amônio produzida. Os custos indiretos da reação também são consideráveis: o lento *turnover* da enzima exige a síntese

de grandes quantidades de proteína para que a produção de amônio seja suficiente para sustentar o crescimento celular¹²; a enzima é inativada irreversivelmente por oxigênio, devido à sensibilidade do cluster M (SHAH e BRILL, 1977), implicando que sua manutenção deverá ocorrer na ausência de oxigênio para a cadeia respiratória (baixa eficiência energética) ou na presença de mecanismos de remoção de oxigênio (dispêndio adicional de energia); e a síntese dos complexos cofatores metálicos requer a ação de no mínimo cinco (e geralmente mais de 12) proteínas diferentes (WANG *et al.*, 2013), o que implica na síntese de grande quantidade de proteínas. A montagem dos cofatores da enzima nitrogenase é um processo complexo, recentemente revisado (HU e RIBBE, 2013; RIBBE *et al.*, 2014). Inicialmente, NifS, uma cisteína desulfurase dependente de piridoxal fosfato (ZHENG *et al.*, 1993), produz enxofre elemental a partir de cisteína, e transfere átomos de enxofre para NifU para formar sucessivamente um cluster [2Fe-2S] e [4Fe-4S] em NifU (YUVANIYAMA *et al.*, 2000), uma proteína dimérica que contém dois clusters [Fe₂-S] permanentes e um sítio para formação de clusters [4Fe-4S] transferíveis. NifU transfere o cluster [4Fe-4S] formado para NifH (proteína Fe), tornando-a funcional (SANTOS *et al.*, 2004). Para a síntese do cluster P ([8Fe-7S]), NifU transfere dois clusters [4Fe-4S] diretamente para NifDK (proteína FeMo), e NifH catalisa a remoção de um enxofre para formar o cluster P (LEE *et al.*, 2009). A formação do cluster M requer a ação de outras proteínas; dois clusters [4Fe-4S] são transferidos de NifU para NifB (SHAH *et al.*, 1994), que reorganiza os oito átomos recebidos, adiciona em átomo de enxofre e um íon carbídeo derivado da clivagem de S-adenosil metionina, e transfere o novo cluster L ([8Fe-9S-C]) para NifEN (WIIG *et al.*, 2011), um heterotetrâmero de estrutura muito semelhante a NifDK (BRIGLE *et al.*, 1987). Em NifEN, o cluster L é maturado com a adição de molibdato e homocitrato (RIBBE *et al.*, 2014); o cluster M maduro é transferido para NifDK por interação direta com NifEN (YOSHIZAWA *et al.*, 2009), gerando a proteína FeMo madura.

1.4.1. Controle da fixação biológica de nitrogênio

Devido ao alto custo metabólico da FBN, praticamente todos os organismos diazotróficos possuem mecanismos bastante estritos de regulação deste processo para evitar o desperdício de energia quando fontes menos custosas de nitrogênio estiverem

¹² Há divergências quanto à quantidade exata de nitrogenase acumulada por diazotrofos durante a fixação de nitrogênio, mas o consenso é de que a concentração intracelular deve ser elevada. Jacobs, Mitchell e Watt (1995), os autores que mais recentemente mediram a concentração intracelular da nitrogenase em *A. vinelandii*, relatam que a concentração da proteína FeMo é 26 µM (6 mg/mL, 4,2% do conteúdo protéico celular), e a concentração da proteína Fe é 45 µM (2,8 mg/mL, 2% do total de proteína), totalizando 6,2% do total de proteína presente no citoplasma. Outros autores que trabalharam com *A. vinelandii* encontraram valores de proteína Fe + FeMo em relação a proteína celular total entre 12,8-44,3% (KLUGKIST *et al.*, 1985) e 6,5-11,9% (DINGLER *et al.*, 1988), dependendo das condições de cultivo. Os valores de concentração total de nitrogenase em outros organismos variam ainda mais, entre 5-40% (*Rhodobacter capsulatus*, dependendo das condições de iluminação – JOUANNEAU, WONG e VIGNAIS, 1985) e 12-40% (*Klebsiella pneumoniae* – EADY *et al.*, 1978).

disponíveis ou quando as condições ambientais forem desfavoráveis à FBN (por exemplo, em alta oxigenação) (DIXON e KAHN, 2004). O controle da transcrição dos genes responsáveis pela síntese e maturação da nitrogenase (genes *nif*) é a principal forma de regulação da FBN nos organismos já estudados.

Embora os genes envolvidos diretamente na reação de redução de dinitrogênio (*nifHDK*) e na montagem dos cofatores metálicos (*nifSUBEN*) sejam bastante conservados, a capacidade de fixar nitrogênio está presente em organismos tão filogeneticamente distantes quanto proteobactérias, cianobactérias e arqueias (RAYMOND *et al.*, 2004; ZEHR *et al.*, 2003), o que por si só implica que a regulação da FBN deve ocorrer através de mecanismos distintos, ao menos em nível transcricional (DIXON e KAHN, 2004). Sugere-se que a distribuição esparsa dos genes *nif* seja resultado de múltiplas transferências horizontais partindo inicialmente de um ancestral metanogênico (BOYD *et al.*, 2011). Ao menos uma arqueia já caracterizada (*Methanococcus maripaludis*) apresenta regulação pós-traducional da atividade da nitrogenase: a interação de NifDK com proteínas PII (Nifl₁ e Nifl₂) inibe a atividade da enzima, e esta inibição é aliviada pelo aumento da concentração de 2OG (DODSWORTH e LEIGH, 2006).

Os sistemas de controle de expressão dos genes *nif* de cianobactérias (TSUJIMOTO *et al.*, 2016) e actinobactérias (KUCHO *et al.*, 2017) ainda são pouco compreendidos; em arqueias, o controle da FBN foi estudado primariamente em *Methanococcus* e *Methanosarcina* (WEIDENBACH *et al.*, 2008), e a regulação da transcrição é feita primariamente através de um repressor transcricional (NrpR). NrpR liga-se aos promotores *nif* e reprime sua transcrição na presença de amônio; a desrepressão ocorre com a ligação de 2OG a NrpR, que conduz a alterações conformacionais neste repressor que diminuem sua afinidade por DNA (WISEDCHAI SRI *et al.*, 2010), permitindo a transcrição dos genes *nif*. Em *M. mazei*, a ativação máxima da transcrição dos genes *nif* requer também a presença de um ativador transcricional denominado NrpA, cuja transcrição também se encontra sob o controle de NrpR (WEIDENBACH *et al.*, 2014). No mesmo organismo, há evidências recentes da importância de um sRNA para a regulação tanto do metabolismo geral de nitrogênio quanto da FBN em particular (PRASE *et al.*, 2017).

Dentre as bactérias Gram-positivas, o metabolismo de nitrogênio parece ser melhor compreendido na classe dos Bacilli. Recentemente, a regulação da FBN em *Paenibacillus riograndensis* foi atribuída ao repressor transcricional GlnR (cotranscrito com GS a partir do operon *glnRA*), uma proteína dimérica cuja atividade repressora é exacerbada pela interação com GS ligada a glutamina e/ou AMP (FERNANDES *et al.*, 2017). A desrepressão dos operons *nif* na ausência de amônio (devida à baixa concentração de glutamina desestabilizar a interação GlnR-GlnA, que por sua vez desestabiliza a interação de GlnA com os promotores *nif*) leva à expressão a partir de possíveis promotores σ^A (FERNANDES

et al., 2017). Já os sistemas de regulação da FBN em proteobactérias foram estudados com muito mais detalhes, e a despeito das peculiaridades de cada um foi possível chegar a alguns modelos gerais.

Em todas as proteobactérias, os *nif* estão organizados em um ou mais operons sob controle de σ^{54} e do ativador transcricional NifA, uma proteína pertencente à família bEBP que reconhece especificamente um motivo conservado TGT-N₁₀-ACA nos promotores *nif* (MORETT e BUCK, 1988). A atividade de NifA, por sua vez, é sempre regulada negativamente pela presença de oxigênio e geralmente regulada negativamente pela presença de amônio, de modo a impedir a produção da nitrogenase e das demais proteínas associadas quando as condições para fixação de nitrogênio não forem adequadas (por exemplo, na presença de oxigênio) ou não forem necessárias (por exemplo, na presença de amônio) (DIXON e KAHN, 2004). Os detalhes específicos da regulação variam amplamente nos diazotrofos em que NifA já foi caracterizada, conforme discute-se na seção 1.4.2 (p. 49).

Além da regulação transcricional, alguns organismos possuem mecanismos de inativação reversível pós-traducional de NifH, que permitem uma resposta rápida a mudanças ambientais súbitas na oxigenação ou na concentração de amônio. *A. vinelandii* possui um sistema próprio de inativação reversível nitrogenase, denominado proteção conformacional, através de interação com uma proteína denominada FeSII, ou Shethna. FeSII é um homodímero que contém um cluster [2Fe-2S] em cada subunidade (MOSHIRI *et al.*, 1995), e interage com as proteínas Fe e FeMo simultaneamente para formar um complexo ternário inativo, mas protegido do dano causado por O₂ (SCHLEISIER *et al.*, 2016).

O sistema de regulação pós-traducional da nitrogenase mais bem caracterizado é denominado DraT/DraG, presente em *Azospirillum brasilense*, *Rhodospirillum rubrum*, e *Azoarcus* SP. BH72 (OETJEN e REINHOLD-HUREK, 2009), que responde à presença de amônio e estado de energia da célula (NORDLUND e HOGBOM, 2013).

Neste sistema, a regulação da atividade da nitrogenase é atingida através da modificação da proteína Fe em resposta ao aumento da concentração de amônio ou a queda dos níveis de energia. A inativação é realizada por DraT, uma proteína monomérica de ~30 kDa que transfere um grupo ADP-ribosil de NADP para um resíduo conservado de arginina na proteína Fe (R101 em *R. rubrum* – POPE *et al.*, 1985), inativando-a (LOWERY e LUDDEN, 1988). Em *R. rubrum*, a atividade de DraT é estimulada por sua interação com GlnB desuridilada (NORDLUND e HOGBOM, 2013). Em *A. brasilense*, a caracterização *in vitro* desta interação mostrou que tanto GlnB quanto GlnZ podem ativar DraT em qualquer estado de uridililação (embora GlnB não uridilada seja o ativador mais eficiente), mas a ativação é negativamente impactada pela interação das proteínas PII com 2OG e é dependente da presença do T-loop (MOURE *et al.*, 2012).

A remoção do grupo adenosil é efetivada por DraG, também uma proteína monomérica de pequena massa (~32 kDa – SAARI *et al.*, 1984). Sua atividade é inibida por interação com GlnZ e AmtB em *A. brasilense* (HUERGO *et al.*, 2006). A regulação ocorre por interação direta entre a face catalítica de DraG e a face lateral do trímero de GlnZ, e eventualmente envolve a formação de um complexo ternário DraG-GlnZ-AmtB, que é transportado para a membrana (HUERGO *et al.*, 2007; RAJENDRAN *et al.*, 2011).

No geral, a razão por trás deste modo de controle pode ser resumida da seguinte maneira: quando, após a produção e maturação de NifHDK, a concentração de amônio aumenta, a proteína GlnB desuridilada interage com a enzima DraT, estimulando sua atividade de transferência de um grupo adenilil. Nestas mesmas condições, GlnZ desuridilada interage simultaneamente com AmtB e com DraG, inativando DraG ao arrastá-la para a membrana e criar impedimentos estéricos para sua interação com NifH (RAJENDRAN *et al.*, 2011). Quando a concentração de amônio cai, ambas as proteínas PII ligam-se a 2OG e são uridiladas; a capacidade de interação de GlnB com DraT diminui muito, inibindo a atividade de DraT. GlnZ uridilada perde a capacidade de interação com AmtB; isto estimula a atividade de DraG, agora presente no citoplasma, que procede com a remoção do grupo adenosil de NifH.

1.4.2. Fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*

H. seropedicae é capaz de fixar nitrogênio sob condições microaerófilas, e a expressão dos genes *nif* ocorre no interior da planta (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). Este organismo não possui nenhum dos dois sistemas de regulação pós-traducional da nitrogenase descritos na seção anterior, embora se tenha observado a inibição pós-traducional da atividade desta enzima (FU e BURRIS, 1989). O mecanismo desta regulação ainda não é bem compreendido, mas parece envolver o sistema GlnK-AmtB (NOINDORF *et al.*, 2011).

O controle da transcrição dos genes *nif* pela proteína NifA parece ser o mecanismo mais importante para a regulação da FBN nesse organismo (CHUBATSU *et al.*, 2012). O cluster *nif* de *H. seropedicae* compreende 47 genes organizados em 7 operons putativos agrupados em uma região contígua, conforme mostrado na figura 8. Estes operons contêm, além dos genes estruturais da nitrogenase (*nifHDK*), genes essenciais para a síntese dos cofatores metálicos F, P e M e genes de função secundária, frequentemente não plenamente compreendida para a fixação de nitrogênio. Um resumo do conhecimento que já se possui a respeito dos genes *nif* de *H. seropedicae* é mostrado na tabela 1.

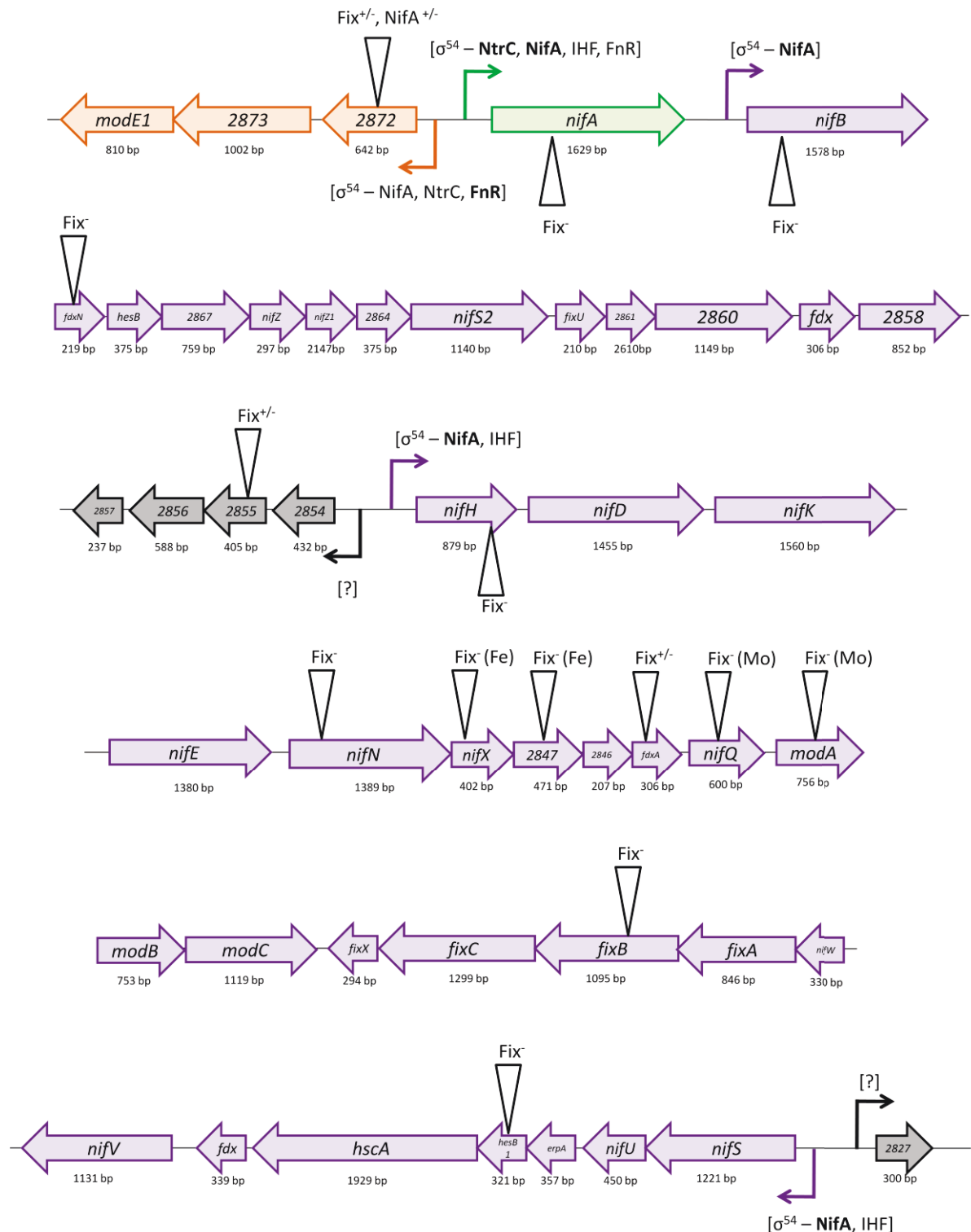


Figura 8 - Genes de fixação de nitrogênio de *H. seropedicae*

A região contínua contendo os genes envolvidos na FBN de *H. seropedicae* contém 47 orfs agrupadas em sete operons distintos. A maioria dos genes se encontra em três operons cuja transcrição é ativada σ^{54} e NifA, mostrados em roxo (*nifBfdxNhesBHsero_2867nifZnifZ1Hsero2864nifS2fixUHsero_2861Hsero_2860fdxHsero_2858*, *nifHDKENXHsero_2847Hsero_2846fdxA* e *nifQmodABC* e *nifSUerpAhesB1hscAfdxnifVWfixABCX*). O gene *nifA* (em verde) é transcrito a partir de seu próprio promotor σ^{54} , e a complexa regulação de sua expressão envolve NtrC, NifA e IHF (WASSEM *et al.*, 2002). Divergente do gene *nifA* encontra-se o operon *Hsero_2872Hsero_2873modE1*, cuja região promotora sobrepõe-se parcialmente com a de

nifA, mas que possui regulação diferente (NOVELLO, 2012). Outros dois operons (*Hsero_2854Hsero_2855Hsero_2856Hsero_2857* e *Hsero_2827*, ambos em cinza) ainda não tiveram sua expressão caracterizada. Os fatores que se sabe serem responsáveis pela regulação da expressão de cada operon estão listados entre colchetes, com os mais relevantes destacados em **negrito**. Os triângulos apontando para alguns genes (**▲**, **▼**) indicam que sua interrupção/deleção causa um fenótipo diferente do selvagem em termos de FBN em *H. seropedicae*. *Fix⁻* indica ausência de fixação de nitrogênio; quando este fenótipo só se manifesta na ausência de ferro ou molibdênio, indica-se com (Fe) e (Mo), respectivamente. *Fix^{+/-}* indica que a fixação de nitrogênio é prejudicada, mas não abolida, pela mutação; *NifA^{+/-}* indica prejuízo da atividade de NifA. Figura adaptada de CHUBATSU *et al.*, 2012; maiores detalhes são expostos na tabela 1.

TABELA 1 – GENES *nif* DE *H. seropedicae*

Gene	Fita	Operon	Posição	Proteína	Função	Caracterização em <i>H. seropedicae</i>
<i>erpA</i>	+	<i>nifS</i>	3	ErpA	Função semelhante à de IscA. Auxilia na transferência de clusters Fe-S; aparentemente envolvida na proteção de clusters Fe-S contra estresse oxidativo (PY <i>et al.</i> , 2018).	Não caracterizado.
<i>fdx</i> (<i>Hsero_2834</i>)	+	<i>nifS</i>	6	Ferredoxina 1x [2Fe-2S] (KAKUTA <i>et al.</i> , 2001)	Maturação de clusters Fe-S?	Não caracterizado.
<i>fdx</i> (<i>Hsero_2859</i>)	-	<i>nifB</i>	12	Ferredoxina 1x [2Fe-2S] (KAKUTA <i>et al.</i> , 2001)	Maturação de clusters Fe-S?	Não caracterizado.
<i>fdxA</i>	-	<i>nifH</i>	9	Ferredoxina 2 x [4Fe-4S]	Transferência de elétrons para NifH.	Inserção de <i>lacZ-Km</i> leva à perda de 70% da atividade da nitrogenase; não está envolvido no <i>switch off</i> da nitrogenase (SOUZA <i>et al.</i> , 2010).
<i>fdxN</i>	-	<i>nifB</i>	2	Ferredoxina 2 x [4Fe-4S]	Transferência de elétrons para NifH e outras proteínas (JIMENEZ-VICENTE <i>et al.</i> , 2014).	Inserção de <i>lacZ-Km</i> leva à perda total da atividade da nitrogenase (SOUZA <i>et al.</i> , 2010).
<i>fixA</i>	+	<i>nifS</i>	9	FixA	Flavoproteína transportadora de elétrons, subunidade β (WEINDENHAUPT <i>et al.</i> , 1996).	Não caracterizado.
<i>fixB</i>	+	<i>nifS</i>	10	FixB	Flavoproteína transportadora de elétrons, subunidade α (WEINDENHAUPT <i>et al.</i> , 1996).	Inserção de cassete Km leva a ausência de crescimento celular na ausência de amônio (SCHWAB, 2006).
<i>fixC</i>	+	<i>nifS</i>	11	FixC	Flavoproteína (ubiquinona)-oxiredutase (WEINDENHAUPT <i>et al.</i> , 1996).	Não caracterizado.

<i>fixU</i>	-	<i>nifB</i>	9	FixU (NifT)	Pouco conhecida; efeito minoritário sobre a fixação de nitrogênio (SULLIVAN <i>et al.</i> , 2013).	Não caracterizado.
<i>fixX</i>	+	<i>nifS</i>	12	FixX	Semelhante a ferredoxina; função desconhecida, possível transferência de elétrons para a nitrogenase (FISCHER, 1994; MILLER, 2016).	Não caracterizado.
<i>hesB</i>	-	<i>nifB</i>	3	Semelhante a IscN	Semelhante a IscA; facilita a transferência de clusters Fe-S para ferredoxinas (DOMBRECHT <i>et al.</i> , 2002).	A mutação polar em <i>fdxN</i> é Fix ⁻ e polar sobre <i>hesB</i> , e o fenótipo Fix ⁻ pôde ser complementado com <i>FdxN</i> plasmidial; portanto, <i>hesB</i> parece não ser essencial (SOUZA <i>et al.</i> , 2010).
<i>hesB1</i>	+	<i>nifS</i>	4	IscA	IscA; doação de íons ferro para IscU (possivelmente NifU) (DING e CLARK, 2004).	Inserção de cassete Km leva a ausência de crescimento celular na ausência de amônio (SCHWAB, 2006).
<i>hscA</i>	+	<i>nifS</i>	5	HscA	Chaperona; auxilia na transferência de clusters Fe-S de IscU (possivelmente NifU) para outras proteínas (possivelmente nifEN) (BONOMI <i>et al.</i> , 2008).	Não caracterizado.
<i>Hsero_2827</i>	-	<i>Hsero_2827</i>	1	Proteína hipotética conservada com domínio VOC; semelhante a lactoil-glutathione liase	Relacionada a resistência a estresse oxidativo?	Promotor não estudado; parece conter dois sítios para ligação de σ^{70} .
<i>Hsero_2846</i>	-	<i>nifH</i>	8	Proteína hipotética moderadamente conservada com domínio <i>rop-like</i>	?	Não caracterizado.
<i>Hsero_2847</i>	-	<i>nifH</i>	7	Proteína hipotética conservada	?	Inserção de cassete leva à perda de 90% da atividade da nitrogenase sob baixa concentração de ferro e 50% sob baixa concentração de Mo, sem efeito sobre atividade de NifA (KLASSEN <i>et al.</i> , 2003).
<i>Hsero_2854</i>	+	<i>Hsero_2854</i>	1	Regulador de resposta hipotético conservado,	?	Não expresso em <i>H. seropedicae</i> independente da concentração de

				maior parte da sequência forma um domínio REC		nitrogênio e oxigênio (Tayná Lima, comunicação pessoal).
<i>Hsero_2855</i>	+	<i>Hsero_2854</i>	2	Globina	Ligação de oxigênio, metabolismo de NO?	Deleção do gene no cromossomo leva à perda de 30% da atividade da nitrogenase (LIMA, 2016).
<i>Hsero_2856</i>	+	<i>Hsero_2854</i>	3	Proteína hipotética conservada	?	Não caracterizado.
<i>Hsero_2857</i>	+	<i>Hsero_2854</i>	4	Proteína hipotética conservada contendo <i>zinc ribbon</i>	?	Não caracterizado.
<i>Hsero_2858</i>	-	<i>nifB</i>	13	Proteína hipotética conservada, família SIR2	?	Não caracterizado.
<i>Hsero_2860</i>	-	<i>nifB</i>	11	Proteína hipotética altamente conservada; possível amino-transferase	?	Não caracterizado.
<i>Hsero_2861</i>	-	<i>nifB</i>	10	Proteína hipotética conservada entre <i>Herbaspirillum</i> fracamente conservada em outros gêneros	?	Não caracterizado.
<i>Hsero_2864</i>	-	<i>nifB</i>	7	Proteína hipotética conservada em <i>Herbaspirillum</i> e em menor grau em rizóbios	?	Não caracterizado.
<i>Hsero_2867</i>	-	<i>nifB</i>	4	Proteína hipotética conservada contendo domínios LRV_FeS e Succ_DH_flav_C	Relacionada ao metabolismo de clusters Fe-S?	Não caracterizado.
<i>Hsero_2872</i>	+	<i>Hsero_2872</i>	1	Globina	Ligação de oxigênio?	Deleção da região central do gene no cromossomo leva à redução de atividade da nitrogenase, da atividade de NifA, e da ativação do promotor <i>nifA</i> (NOVELLO, 2012). Promotor contém os mesmos sítios para ligação de NifA, IHF,

						NtrC, e FnR do promotor <i>nifA</i> , e tem sítio próprio para σ^{54} . Atividade do promotor influenciada parcialmente por NtrC, NifA, e fortemente por FnR (NOVELLO, 2012).
<i>Hsero_2873</i>	+	<i>Hsero_2872</i>	2	Proteína hipotética conservada	?	Não caracterizado.
<i>modA</i>	-	<i>nifH</i>	11	ModA	Transportador ABC; componente extracelular de ligação a molibdênio (HOLLENSTEIN <i>et al.</i> , 2007).	Inserção de cassete leva à perda da atividade da nitrogenase na ausência de Mo; atividade idêntica à selvagem na presença de Mo (KLASSEN, 2000).
<i>modB</i>	-	<i>nifH</i>	12	ModB	Transportador ABC; proteína transportadora transmembrana (HOLLENSTEIN <i>et al.</i> , 2007).	Não caracterizado.
<i>modC</i>	-	<i>nifH</i>	13	ModC	Transportador ABC; ATPase localizada na face citoplasmática (HOLLENSTEIN <i>et al.</i> , 2007).	Não caracterizado.
<i>modE1</i>	+	<i>Hsero_2872</i>	3	ModE	Regulação da transcrição gênica em resposta a molibdênio.	Expressão e purificação em <i>E. coli</i> ; caracterização de mutantes não efetuada (SOUZA, 2007).
<i>nifA</i>	-	<i>nifA</i>	1	NifA	Ativação da transcrição dos promotores <i>nif</i> .	Revisada em detalhe na seção 1.6 (p. 63).
<i>nifB</i>	-	<i>nifB</i>	1	NifB	Síntese de precursor do cluster M da dinitrogenase (HU e RIBBE, 2016).	Inserção de cassete leva à perda de atividade da nitrogenase. Promotor caracterizado; contém dois sítios para ligação de NifA, possivelmente para IHF (REGO <i>et al.</i> , 2006), totalmente dependente de NifA.
<i>nifD</i>	-	<i>nifH</i>	2	Dinitrogenase, cadeia α	Redução de dinitrogênio a amônio.	-
<i>nifE</i>	-	<i>nifH</i>	4	NifE	Semelhante a NifD; <i>scaffold</i> para montagem do cluster M (FAY <i>et al.</i> , 2016).	Pertencimento ao operon <i>nifH</i> determinada por Klassen <i>et al.</i> (1999).
<i>nifH</i>	-	<i>nifH</i>	1	Dinitrogenase redutase	Transferência de elétrons para NifDK; inserção de clusters metálicos em NifDK (HU <i>et al.</i> , 2006;	Inserção de cassete Km leva a ausência de crescimento celular na ausência

					JASNIEWSKI <i>et al.</i> , 2018).	de amônio (SCHWAB, 2006). Promotor caracterizado; contém dois sítios para ligação de NifA, um para IHF, e um para σ^{54} (PEDROSA <i>et al.</i> , 1997), totalmente dependente de NifA.
<i>nifK</i>	-	<i>nifH</i>	3	Dinitrogenase, cadeia β	Redução de dinitrogênio a amônio.	-
<i>nifN</i>	-	<i>nifH</i>	5	NifN	Semelhante a NifK; <i>scaffold</i> para montagem do cluster M (FAY <i>et al.</i> , 2016).	Inserção de cassete leva a grande perda da atividade da nitrogenase (KLASSEN <i>et al.</i> , 1999).
<i>nifQ</i>	-	<i>nifH</i>	10	NifQ	Transferência de molibdênio para NifEN para geração do cluster M (HERNANDEZ <i>et al.</i> , 2008).	Inserção de cassete elimina a atividade da nitrogenase, mas apenas na ausência de molibdato (KLASSEN, 2000).
<i>nifS</i>	+	<i>nifS</i>	1	NifS; cisteína desulfurase	Montagem de clusters Fe-S; produção de enxofre elemental para a síntese de clusters Fe-S (YUVANIYAMA <i>et al.</i> , 2000).	Caracterização indireta da expressão do operon (SCHWAB, 2006). Promotor <i>nifS</i> contém dois sítios para ligação de NifA, um para IHF, e um σ^{54} . Transposons <i>lacZ-Km</i> nos genes 2831 e <i>fixB</i> detectaram aumento de expressão em baixo amônio.
<i>nifS2</i>	-	<i>nifB</i>	8	Semelhante a NifS; cisteína desulfurase	Montagem de clusters Fe-S; produção de enxofre elemental para a síntese de clusters Fe-S (YUVANIYAMA <i>et al.</i> , 2000).	Não caracterizado.
<i>nifU</i>	+	<i>nifS</i>	2	NifU	Montagem de clusters Fe-S; <i>scaffold</i> para a formação de clusters Fe-S (YUVANIYAMA <i>et al.</i> , 2000).	Não caracterizado.
<i>nifV</i>	+	<i>nifS</i>	7	NifV	Necessário para a formação correta do cluster M (TRUE <i>et al.</i> , 1990).	Não caracterizado.
<i>nifW</i>	+	<i>nifS</i>	8	NifW	Interação com NifDK, possível proteção contra oxigênio (KIM e BURGESS, 1996).	Não caracterizado.
<i>nifX</i>	-	<i>nifH</i>	6	NifX	Transferência do cofator sintetizado por NifB para NifEN; reservatório decofator de NifB para	Inserção de cassete leva à perda de 90% da atividade da nitrogenase sob

					transmissão apenas sob condições favoráveis (HERNANDEZ <i>et al.</i> , 2007).	baixa concentração de ferro e 50% sob baixa concentração de Mo, sem efeito sobre atividade de NifA (KLASSEN <i>et al.</i> , 2003).
<i>nifZ</i>	-	<i>nifB</i>	5	NifZ	Maturação do cluster P; possível atividade de chaperona (HU <i>et al.</i> , 2007).	Não caracterizado.
<i>nifZ1</i>	-	<i>nifB</i>	6	Semelhante a NifZ	Maturação do cluster P; possível atividade de chaperona (vide supra).	Não caracterizado.

1.5. PROTEÍNAS NifA

As proteínas NifA pertencem à família das bEBPs (tal qual NtrC, com a qual têm homologia detectável – DRUMMOND *et al.*, 1986), e possuem uma arquitetura conservada de três domínios funcionais: um domínio N-terminal do tipo GAF (HO *et al.*, 2000), de função regulatória; um domínio central AAA+ (HANSON e WHITEHEART, 2005) contendo o motivo GAFTGA para interação com σ^{54} e os motivos de Walker para clivagem de ATP; e um domínio C-terminal contendo um motivo hélice-volta-hélice que reconhece o promotor dos genes *nif* (STUDHOLME e DIXON, 2003). Os três domínios freqüentemente estão ligados por interdomínios característicos, denominados Q-linker (entre os domínios GAF e AAA+ – WOOTTON e DRUMMOND, 1989) e ID linker (entre os domínios AAA+ e C-terminal – FISCHER, 1994).

Em termos de regulação de sua atividade, os estudos com proteínas NifA de diferentes organismos definiram dois modelos diferentes de regulação: um dependente da proteína regulatória NifL, e outro independente de NifL, conforme ilustrado na figura 9.

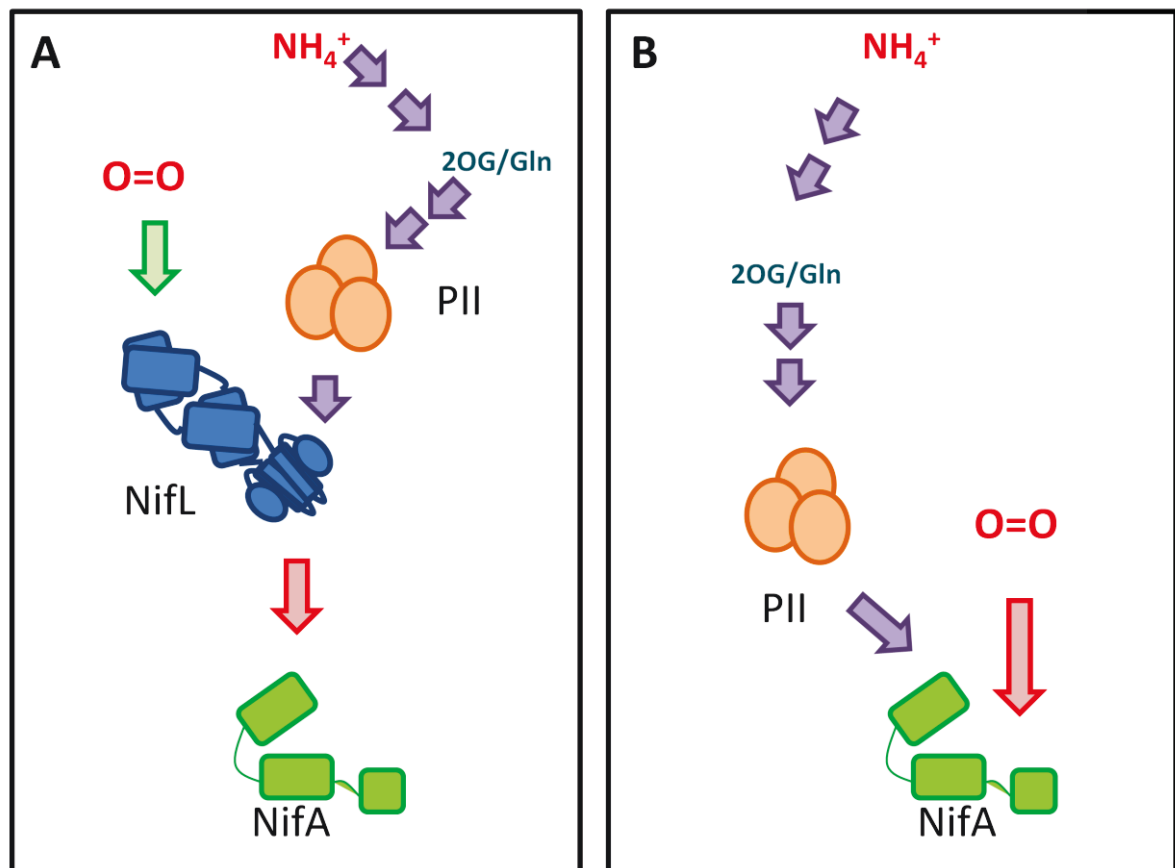


Figura 9 - Dois modelos de regulação de NifA.

Em ambos os modos de regulação descritos, a atividade de NifA é regulada negativamente por oxigênio e por abundância de amônio; a principal diferença dos modos de regulação está na presença de NifL, uma proteína reguladora que transmite os sinais regulatórios para NifA. Flechas **vermelhas** indicam inibição, flechas **verdes** indicam estimulação, e flechas **roxas** indicam que há variedade do efeito causado entre os organismos já estudados. **(A)**, regulação da atividade de NifA por NifL caracterizada em γ -proteobactérias (*Azotobacter*, *Klebsiella*, e *Pseudomonas*) e em *Azoarcus*. NifA é uma proteína intrinsecamente ativa cuja atividade é inibida por NifL sob certas condições. A oxidação do domínio PAS N-terminal de NifL estimula sua atividade inibitória sobre NifA; a interação com PII transmite o sinal da presença ou ausência de amônio, embora o efeito da interação seja bastante diferente entre os organismos estudados (ver texto abaixo). **(B)**, regulação da atividade de NifA em α e β -proteobactérias. Não há proteína NifL; a atividade da proteína NifA é inibida diretamente pela presença de oxigênio, e a presença ou ausência de amônio é detectada através de interação direta com proteínas PII. Os detalhes da regulação por amônio variam bastante entre os organismos já estudados (ver texto abaixo).

O primeiro modelo de regulação foi descrito para as proteínas NifA de *A. vinelandii* e *Klebsiella pneumoniae*, ambas pertencentes à classe γ das proteobactérias, embora também ocorra em ao menos um gênero de β -Proteobacteria, *Azoarcus* (EGENER *et al.*, 2002). Nestes organismos, *nifA* é co-transcrito com o gene *nifL*, que codifica a proteína sensora NifL, que interage diretamente com NifA de forma inibitória quando as condições celulares são inadequadas para a fixação de nitrogênio (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). Organismos que expressam NifL possuem proteínas NifA intrinsecamente ativas e

insensíveis aos níveis de oxigênio e amônio; a interação com NifL confere a inibição em resposta a sinais intracelulares de alto amônio e alta oxidação.

Em *A. vinelandii* (Azotobacteriaceae, Pseudomonadales), cujo sistema NifL-NifA foi extensamente caracterizado, as duas proteínas são expressas a partir de um promotor de expressão constitutiva (RAINA *et al.*, 1993). NifL é uma flavoproteína dimérica cujos monômeros são formados por dois domínios PAS in tandem, um domínio H (helical) central, e um domínio GHKL C-terminal (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). Em *A. vinelandii*, o domínio PAS1 N-terminal contém um cofator FAD sensível ao estado de oxidação celular (HILL *et al.*, 1996). O segundo domínio PAS, PAS2, está envolvido na transdução do sinal de oxidação de PAS1 para o domínio H, através de alteração de seu estado de oligomerização (SLAVNY *et al.*, 2009; LITTLE *et al.*, 2011).

Os domínios H e GHKL são semelhantes aos das proteínas histidina-quinases; NifL possui um resíduo conservado para autofosforilação, mas não possui atividade quinásica e este resíduo não é importante para sua capacidade de regular NifA (LITTLE *et al.*, 2007). Apesar disso, o domínio GHKL de NifL requer ligação a ATP ou ADP para inibir eficientemente a proteína NifA (EYDMANN *et al.*, 1995). A região do domínio H, em especial o resíduo R306, parece ser a responsável pela interação diretamente com o domínio GAF e/ou interdomínio Q de NifA (MONEY *et al.*, 2001; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004c).

O estado de oxidação de NifL é responsável pela ativação ou repressão de NifA em resposta aos níveis de oxigênio: NifL oxidada inibe a atividade de NifA (HILL *et al.*, 1996). NifL também é responsável pela regulação da atividade de NifA por amônio: a interação de GlnK desuridililada com NifL reforça a inibição de NifL sobre NifA, mesmo se GlnK estiver ligada a 2OG (LITTLE *et al.*, 2002). A uridililação de GlnK impede a interação com NifL, aliviando a inibição quando NifL estiver reduzida (LITTLE *et al.*, 2000; RUDNICK *et al.*, 2002). A interação entre NifL e GlnK envolve o T-loop de GlnK e o domínio GHKL de NifL (LITTLE *et al.*, 2002; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). Adicionalmente, o domínio GAF de NifA de *A. vinelandii* interage com 2OG, e esta interação alivia a inibição de NifL sob GAF se NifL estiver reduzida (LITTLE e DIXON, 2003; MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004b).

O sistema NifL/NifA de *K. pneumoniae* (γ -Proteobacteria, Enterobacteriaceae, Enterobacterales) é semelhante ao de *A. vinelandii*, mas possui algumas diferenças fundamentais: NifL possui apenas um domínio PAS e seus domínios H e GHKL são menos claramente definidos (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). Neste organismo, o operon *nifLA* está sob controle de NtrC (HE *et al.*, 1997), e a interação de NifL com a proteína GlnK alivia a inibição de NifA, independente do estado de uridililação de GlnK (HE *et al.*, 1998). O alívio da inibição de NifL não parece requerer especificamente GlnK, mas sim um aumento da concentração de PII, uma vez que GlnB é capaz de substituir GlnK neste sistema quando expressa heterologicamente (ARCONDEGUY *et al.*, 1999). Ainda, NifA de *K. pneumoniae* não

é capaz de ligar 2OG (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). Há evidências de que GlnK de *K. pneumoniae* interage com NifA além de NifL, que tanto o T-loop quanto a porção C-terminal de GlnK são importantes para o alívio da inibição de NifL, e que a ligação de GlnK a 2OG impede a interação de GlnK com NifA, mas não com NifL (GLOER *et al.*, 2008).

Estudos em outros organismos que possuem o sistema NifL-NifA de regulação da transcrição dos genes *nif* foram bem mais limitados; sabe-se que este sistema está presente em *Pseudomonas stutzeri* (XIE *et al.*, 2006) e *Azoarcus* sp. BH72 (EGENER *et al.*, 2002).

Um segundo modelo de regulação ocorre em membros das classes α e β das proteobactérias, em organismos que não possuem NifL. Na ausência da proteína transmissora de sinal, a atividade da proteína NifA desses organismos é inibida diretamente por oxigênio e regulada pela ação de proteínas PII.

O mecanismo da sensibilidade de NifA de α e β -proteobactérias a oxigênio não é bem compreendido, mas parece ser bastante conservado no grupo. Todas as proteínas NifA sensíveis a O_2 possuem um conjunto de 4 cisteínas localizadas em um motivo C-X₁₁-C-X₁₉-C-X₄-C presente no final do domínio central e início do interdomínio ID; esta sequência está ausente nas proteínas NifA reguladas por NifL. A substituição de qualquer destes resíduos por serina gera proteínas completamente inativas (FISCHER *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 2009); Fischer e colaboradores (1988) também observaram que a ação de quelantes metálicos inibe a atividade de NifA de *Bradyrhizobium japonicum* (cuja proteína NifA é sensível a O_2), mas não a de *K. pneumoniae* (que possui NifL, e cuja proteína NifA não é intrinsecamente sensível a O_2). Isto levou à proposição de que estes quatro resíduos de cisteínas coordenariam um cluster de ferro-enxofre, cuja forma reduzida conferiria atividade a NifA (FISCHER *et al.*, 1994).

A regulação da atividade das proteínas NifA independentes de NifL por amônio é melhor compreendida que a sensibilidade a oxigênio, porém bem mais diversa dentro do grupo. No geral, todas as proteínas NifA sensíveis a O_2 que possuem regulação negativa por amônio recorrem à interação entre seu domínio GAF N-terminal e alguma proteína da família PII para a sinalização dos níveis de amônio intracelulares, como será mostrado na revisão de literatura que se segue.

Em *A. brasilense* (α -Proteobacteria, Rhodospirillaceae, Rhodospirillales), talvez o mais bem estudado dos organismos deste grupo, o domínio GAF N-terminal de NifA é responsável pela inibição intrínseca de NifA; sua remoção gera uma proteína com atividade não regulada por íons amônio (ARSÈNE *et al.*, 1996) na ausência de PII por mecanismos não plenamente compreendidos. A expressão *in trans* dos domínios GAF e Central+C-terminal em *E. coli* levou à inibição da atividade do domínio Central+C-terminal, sugerindo que a interação direta entre os resíduos dos diferentes domínios poderia explicar a inibição de NifA por seu domínio GAF (SOTOMAIOR *et al.*, 2012). A inibição de NifA somente é

aliviada pela interação com GlnB, mas não com GlnZ (ARAÚJO *et al.*, 2004), em condições de baixa concentração de amônio.

Experimentos de duplo híbrido (CHEN *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005) e estudos *in vitro* mostraram a interação direta entre GlnB e o domínio GAF de NifA sob certas condições. A interação entre GAF e GlnB somente foi detectada na presença de ATP e 2OG ligados a GlnB (SOTOMAIOR *et al.*, 2012). Apesar de a interação *in vitro* de GlnB com GAF ter sido observada com PII desuridililada, experimentos *in vivo* sugerem que a uridililação de GlnB é fundamental para a ativação de NifA em *A. brasilense* (INABA *et al.*, 2015). Zhou e colaboradores (2008) sugeriram que as regiões entre os resíduos de aminoácidos 66 e 88 e os resíduos 165 e 176 da proteína NifA estão envolvidos na interação com GlnB. A substituição dos resíduos de tirosina Y18, Y43, e Y53 por fenilalanina no domínio GAF gera proteínas ativas na ausência de GlnB, mas não à perda de regulação por amônio (ARSÈNE *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2005) – um fenótipo de difícil explicação.

A transcrição do gene *nifA* em *A. brasilense* parece ser negativamente afetada – mas não reduzida a zero – por oxigênio e amônio, possivelmente devido à ação de repressores transcricionais da família Fnr e de algum regulador sensível a nitrogênio ainda não caracterizado (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999).

Rhodospirillum rubrum (α -Proteobacteria, Rhodospirillaceae, Rhodospirillales) aparenta ser semelhante a *A. brasilense* quanto à regulação da atividade de NifA. A proteína NifA deste organismo também é intrinsecamente inativa, aparentemente devido à ação de seu domínio GAF (embora Zou e colaboradores (2008) relatem não ter conseguido a construção de uma versão N-truncada ativa, não regulada por amônio). Este organismo possui três parálogos de PII (GlnB, GlnK, e GlnJ – JOHSSON e NORDLUND, 2007), mas apenas GlnB é capaz de ativar NifA (ZHANG *et al.*, 2001).

NifA de *R. rubrum* parece ser ativada pela interação com GlnB-UMP (ZHANG *et al.*, 2005), e o T-loop parece ser uma região de GlnB importante para a interação. A capacidade de quimeras de GlnJ contendo resíduos de GlnB de ativar NifA depende de os resíduos entre as posições 47-88 provirem de GlnB, e é reforçada caso os segmentos N-terminal (1-46) ou C-terminal estejam presentes também; isso sugere que a região que contém a maior parte do T-loop (resíduos 37-54) é essencial para a ativação de NifA, mas resíduos encontrados em outras partes da proteína podem ser relevantes para reforçar a interação/ativação. A importância do T-loop é reforçada pelo fato de que algumas substituições de resíduos do T-loop de GlnJ por seus equivalentes em GlnB (V45L, N54D) aumentam perceptivelmente a capacidade das quimeras de PII de ativar NifA (embora Q42H não tenha efeito). Além de resíduos no T-loop, observou-se que substituições nos resíduos 3-5, 17, 109, 110 e 112 estimularam a atividade de quimeras de PII; substituições dos

segmentos entre os resíduos 21-25 nas quimeras de PII não alteraram o fenótipo de ativação de NifA por PII (ZHANG *et al.*, 2004).

Zhu e colaboradores (2006) realizaram experimentos de duplo híbrido em levedura para selecionar mutantes aleatórios de GlnB com melhor capacidade de interagir com NifA mesmo na ausência de uridililação. A maioria das substituições detectadas localizou-se no T-loop (H42Q, L45P, L45M, R47P, V52D, V52I, F55L, V59A), mas não exclusivamente nesta região (K12R, E15A, K17T, I28L, R72C, A95T – ZHU *et al.*, 2006). A mutagênese aleatória de NifA e seleção de mutantes com capacidade aumentada de interação com GlnB levou ao isolamento persistente de substituições no resíduo M173; estranhamente, este mutante não requer interação com GlnB para sua ativação (ZOU *et al.*, 2008).

A transcrição de *nifA* é independente de NtrC em *R. rubrum*, e aparenta ser constitutiva (ZHANG *et al.*, 2000).

Rhodobacter capsulatus (α -Proteobacteria, Rhodobacteraceae, Rhodobacterales), por sua vez, possui duas cópias do gene *nifA* cujos produtos diferem apenas nos 19 resíduos N-terminais, e aparentam ser funcionalmente semelhantes (MASEPOHL *et al.*, 1988). Diferentemente das proteínas NifA de *A. brasilense* e *R. rubrum*, NifA de *R. capsulatus* é intrinsecamente ativa mesmo na presença de amônio, devendo ser regulada negativamente pela interação com as proteínas GlnB e GlnK. Duplos mutantes *glnB⁻/glnK⁻* de *R. capsulatus* apresentam transcrição constitutiva dos genes *nif* mediada por NifA, independentemente da concentração de amônio (DREPPER, 2003). Ensaio de duplo híbrido identificaram interações de tanto NifA1 quanto NifA2 com GlnB e GlnK de *R. capsulatus*, e também de NifA1 com NifA2 (PAVLOWSKI *et al.*, 2003). A busca por mutantes aleatórios de NifA1 e NifA2 que escapassem à inibição por PII levou à identificação de substituições tanto no domínio GAF quanto no domínio C-terminal (V42E, L66Q, I460F, E477Q, K531T); analisando as combinações entre algumas destas mutações, Paschen e colaboradores (2001) sugeriram a possibilidade de interação entre estes dois domínios. Os mesmos autores relatam que a construção de uma variante N-truncada funcional de NifA1 ou NifA2 não foi possível.

Possivelmente em função da atividade intrínseca, negativamente regulada de NifA em *R. capsulatus*, a regulação transcricional dos genes *nif* em *R. capsulatus* envolve mais fatores transcricionais do que o já descrito em outros diazotrofos. Os *nifA1* e *nifA2* estão sob controle transcricional de NtrC (HUBNER *et al.*, 1991; DREPPER, 2003), e sua expressão máxima depende de Hfq¹³ (DREPPER *et al.*, 2002), uma chaperona de RNA envolvida na regulação pós-transcricional da expressão gênica primariamente através da promoção de interação entre o mRNA e um sRNA complementar a uma porção da sequência (KAVITA,

¹³ Originalmente, o gene *hfq* de *R. capsulatus* e de *Azorhizobium caulinodans* foi denominado *nrfA*; não confundir com o gene *nrfA* que codifica a nitrito redutase NrfA (WELSH *et al.*, 2014).

METS e GOTTESMAN, 2018). A identidade do possível sRNA associado ao mRNA de *nifA1* e *nifA2* não é conhecida. O gene *nifA2* também tem sua expressão estimulada por RegA, um regulador envolvido na resposta de *R. capsulatus* ao estado redox (ELSEN *et al.*, 2000). Os genes *nif* de *R. capsulatus* não estão sob controle exclusivo de NifA: sua transcrição é reprimida pela ligação competitiva HrvA a alguns dos promotores *nif* (KERN *et al.*, 1998; RAABE *et al.*, 2002). HrvA também está envolvido com a regulação da expressão de genes do fotossistema I; sua interrupção conduz à baixa expressão de *puhA*, *pufl* (que codificam genes estruturais do fotossistema I) e ausência de resposta da expressão destes genes à luz, o que leva a dificuldades de crescimento fototrófico em *R. capsulatus* quando a luminosidade é baixa (BUGGY, SGANGA e BAUER, 1994). Uma possível relação entre HrvA e a resposta estridente à ausência de carbono também foi sugerida (MASUDA e BAUER, 2003).

A proteína NifA de *Azorhizobium caulinodans* (α -Proteobacteria, Xanthobacteraceae, Rhizobiales), menos caracterizada, parece seguir o mesmo mecanismo básico de regulação visto em *R. capsulatus*; um duplo mutante *glnB⁻ glnK⁻* apresentou expressão dos genes *nif* mesmo na presença de amônio (MICHEL-REYDELLET e KAMINSKI, 1998). A regulação transcricional de NifA neste organismo também parece ser bastante controlada, envolvendo repressão por oxigênio e amônio mediada por FixK e Hfq (KAMINSKI e ELMERICH, 1998).

Em outros rizóbios, a tendência da regulação de NifA pode ser resumida em três características: (1) sensibilidade de NifA a oxigênio, (2) ausência de modulação da atividade de NifA por amônio, e (3) complexo padrão de regulação transcricional, respondendo quase que exclusivamente à concentração de oxigênio (FISCHER, 1994). Ao menos uma proteína NifA rizobial (isolada de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*) sequer possui o domínio GAF regulatório (IISMA *et al.*, 1989). A única proteína NifA rizobial a ser caracterizada em um sistema de expressão heteróloga foi a de *Sinorhizobium meliloti*. Esta proteína é ativa em *E. coli*, e sua versão N-truncada também é funcional; deleções progressivas de trechos do domínio GAF não foram ativas (BEYNON, WILLIAMS, e CANNON, 1988; HUALA e AUSUBEL, 1989).

Por fim, a proteína NifA de *Rhodopseudomonas palustris* (α -Proteobacteria, Bradyrhizobiaceae, Rhizobiales) parece ser inativa na presença de nitrogênio; trabalhos com enfoque na produção de H₂ a partir da atividade da nitrogenase relataram que quatro mutações no Q-linker (região que conecta os domínios GAF N-terminal e AAA+ central) – M202K, Q209P, L212R, S213P (REY *et al.*, 2007) e uma deleção de 48 nucleotídeos no gene *nifA* correspondendo a 16 resíduos do Q-linker (Δ 202-217) levaram à alta produção de nitrogenase independentemente da concentração de amônio no meio de cultura (ADESSI *et al.*, 2012).

1.6. A PROTEÍNA NifA DE *H. seropedicae*

NifA de *H. seropedicae* é uma proteína de 542 resíduos de aminoácidos contendo os três domínios funcionais comuns às demais proteínas NifA. O domínio GAF N-terminal abrange os resíduos 1-184 e é essencial para inibição da atividade de NifA na presença de íons amônio / ausência de quantidade de proteínas PII. O domínio GAF é conectado pelo interdomínio Q (Q-linker, resíduos 185-203) ao domínio AAA+ central (resíduos 204-440). O domínio central contém os motivos de Walker para ligação e hidrólise de ATP (Walker A, resíduos 231-238; Walker B, resíduos 294-303) e o motivo GAFTGA necessário para interação com σ^{54} (resíduos 268-283). O domínio AAA+ conecta-se ao domínio C-terminal através do longo interdomínio ID (ID linker, resíduos 441-499). Ao final do domínio AAA+ e início do interdomínio ID localiza-se um conjunto de 4 cisteínas com espaçamento conservado entre as proteínas NifA intrinsecamente sensíveis a O_2 (resíduos 414, 426, 446, e 451). Por fim, o domínio HTH C-terminal (resíduos 500-542) contém o motivo hélice-volta-hélice que interage com os promotores *nif*. Uma representação resumida da divisão dos domínios e dos motivos mais importantes é mostrada na figura 10. O conhecimento acumulado a respeito de NifA de *H. seropedicae* será revisado com maior abrangência.

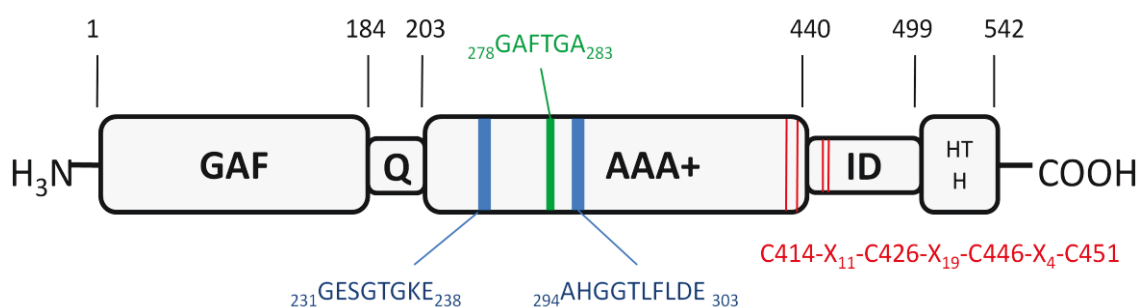


Figura 10 - Representação esquemática de NifA de *H. seropedicae*.

Os domínios GAF (resíduos 1-184), AAA+ (resíduos 204-440) e HTH (resíduos 500-542) são separados pelos interdomínios Q e ID. Os motivos de Walker (Walker A, 231-238, e Walker B, 294-303) para interação com ATP localizam-se no domínio central e estão marcados em azul; entre eles está o motivo GAFTGA (273-283), marcado em verde, responsável por interagir com σ^{54} . O cluster de 4 cisteínas (resíduos 414, 426, 446, 451), em vermelho, localiza-se parte no final do domínio central e parte no linker ID.

O gene *nifA* de *H. seropedicae* foi identificado em um plasmídeo capaz de restaurar a fixação de nitrogênio em uma estirpe *nifA*⁻ de *A. brasilense* (SOUZA *et al.*, 1991) e seqüenciado juntamente com sua região promotora e com o gene *nifB* à jusante (SOUZA *et al.*, 1991); a análise da seqüência promotora de *nifA* identificou possíveis sítios para a ligação de NtrC, NifA, IHF, e σ^{54} (o gene *nifB* à jusante possui sua própria região promotora, caracterizada posteriormente por Rego e colaboradores em 2006). A partir de então, diversos trabalhos caracterizaram aspectos da regulação transcricional do gene *nifA*, da regulação da atividade do produto gênico e da identificação de seus alvos de regulação.

A região promotora nativa do gene *nifA* foi estudada por Souza e colaboradores (2000) e Wassem e colaboradores (2000, 2002). Souza e colaboradores (2000) confirmaram a funcionalidade do sítio de ligação do promotor a NtrC ao introduzir em *E. coli* e *H. seropedicae* uma série de fusões transcricionais contendo fragmentos do promotor *nifA* controlando a transcrição de *lacZ*. Os experimentos mostraram que o promotor *nifA* é reprimido na presença de íons amônio, mas pouco reprimido por oxigênio; que o sítio de interação do promotor com σ^{54} é essencial para ativação da transcrição; e que o sítio de interação com NifA não é necessário para a ativação, mas poderia ser importante para a máxima atividade do promotor. Os autores também confirmaram a interação de NifA com os sítios de ligação de *nifA* em seu próprio promotor por DNA *footprinting*, e localizaram a primeira base do mRNA de *nifA* a 11 bases de distância do elemento -12 do sítio de ligação de σ^{54} .

Um trabalho subsequente caracterizou o papel de IHF, uma proteína que se liga a sítios específicos no DNA e induz seu dobramento (RICE *et al.*, 1996), no controle da transcrição de *nifA* por NtrC. Trabalhando com proteínas purificadas, Wassem e colaboradores (2000) mostraram que a ligação de IHF estimula a transcrição *in vitro* mediada por NtrC e inibe a transcrição mediada por NifA. Um segundo trabalho avaliou o efeito da deleção do sítio IHF sobre a atividade do promotor *nifA* em *H. seropedicae*, e relatou que a deleção deste sítio aumenta em muito a expressão de *nifA* mediada por NifA (WASSEM *et al.*, 2002) – confirmando que IHF inibe a transcrição via NifA, e propondo que a função regulatória de IHF seria justamente prevenir a expressão descontrolada de *nifA* por seu próprio produto gênico. O mesmo trabalho introduziu uma série de deleções e mutações pontuais nos sítios de ligação de NifA (seqüência TGT-N₁₀-ACA), NtrC (GCA-N₉-TGC), IHF (WATCAANNNTTTR – HALES *et al.*, 1994) e σ^{54} ([CT]TGGCA[CT][GA]-N₅-TGC[AT][TA] – LIANG *et al.*, 2017) ao promotor, e estabeleceu as principais características da transcrição de *nifA*: (1) transcrição dependente de σ^{54} ; (2) forte ativação por NtrC estimulada por baixa concentração de amônio e por ligação de IHF a seu sítio no promotor; e (3) forte ativação por NifA estimulada por baixa concentração de amônio e oxigênio, e inibida por ligação de IHF a seu sítio no promotor (WASSEM *et al.*, 2002).

Um trabalho posterior observou que a expressão de *nifA* (medida através de uma fusão transcricional *nifH::lacZ*) é reduzida em *H. seropedicae exbD⁻*, um mutante que tem dificuldade em captar íons ferro do ambiente (ROSCONI *et al.*, 2006). O mecanismo desta redução de expressão ainda não é conhecido.

A maioria dos trabalhos com a proteína NifA teve por foco entender o mecanismo de regulação de sua atividade, com a intenção de melhor compreender o controle da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*. Souza e colaboradores (1999) observaram que a proteína NifA de *H. seropedicae* não é ativa em *E. coli* independente da concentração de amônio ou

de oxigênio na cultura, mas uma versão N-truncada ($\Delta(1-203)$ NifA, uma proteína contendo apenas os resíduos 204-542 de NifA de *H. seropedicae*) é ativa em *E. coli*. Esta variante $\Delta(1-203)$ NifA tem sua atividade inibida por oxigênio, porém não regulada por amônio. Esta importante descoberta mostrou que a regulação da atividade de NifA por amônio e por oxigênio estão espacialmente separadas em NifA de *H. seropedicae*: o domínio GAF N-terminal é responsável pela inibição de NifA na presença de amônio (ou, conforme se argumentou, é responsável pela inibição de NifA na ausência de um ativador específico – NifA expressa a partir de plasmídeo foi ativa em *H. seropedicae nifA⁻* e *A. brasilense nifA⁻*), ao passo que a inativação por oxigênio é característica dos domínios Central e C-terminal. O mesmo trabalho mostrou que a omissão de íons ferro do meio de cultura ou sua remoção com EDTA causava queda da atividade de NifA, tal qual ocorre com NifA de rizóbios (FISCHER, 1994), sugerindo que sua atividade seria dependente deste íon.

A regulação de NifA por oxigênio revelou-se difícil de estudar. Monteiro e colaboradores (2003a) observaram que a proteína $\Delta(1-203)$ NifA é inativa e rapidamente degradada quando expressa em *E. coli fnr⁻*, e que este efeito pode ser reproduzido em *E. coli* selvagem com a adição de EDTA, um quelante de cátions divalentes, ao meio de cultura.

Oliveira e colaboradores (2009) realizaram a substituição dos resíduos de cisteína 414, 426, 446, e 451 por serina, e observaram que as variantes de $\Delta(1-203)$ NifA contendo estas mutações eram completamente inativas quando expressas em *E. coli*, indicando que os resíduos mutagenizados têm papel fundamental na integridade da proteína (dada sua distância do sítio catalítico de AAA+, sua importância é possivelmente atribuída à manutenção da estrutura do domínio AAA+. Ensaios de ligação ao promotor *nifB in vitro* não mostraram prejuízo causado pelas substituições quanto à interação com DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2009). O mesmo trabalho relatou a construção de duas proteínas quiméricas: NifAQ1, que contém o domínio GAF de *H. seropedicae* e os domínios AAA+ e HTH de *A. vinelandii*, cuja atividade não foi inibida nem por amônio nem por oxigênio em *E. coli*, e NifAQ2, que contém o domínio GAF de *A. vinelandii* e os domínios AAA+ e HTH de *H. seropedicae*, cuja atividade foi inibida por oxigênio (e não por amônio).

Mais recentemente, o estudo da regulação dos promotores *nifA* e *nifH* em *H. seropedicae* contendo várias combinações de deleções de suas três proteínas Fnr mostrou que a deleção de *fnr1* e *fnr3* conduz a um aumento da expressão e da atividade de NifA. A regulação parece ser indireta, mediada pelo aumento da taxa respiratória nos mutantes (BATISTA *et al.*, 2015).

A partir de 1999, Monteiro e colaboradores (1999, 1999b, 2001, 2003) trabalharam extensivamente na caracterização dos domínios funcionais de NifA. O padrão de regulação da proteína $\Delta(1-203)$ NifA (inibição por oxigênio, ausência de inibição por amônio) foi

confirmado com uma nova construção que permitiu sua superexpressão em *E. coli*; esta proteína foi então purificada e sua capacidade de interação específica com o promotor *nifB* de *H. seropedicae* foi confirmada por ensaios de DNA *footprinting* e retardamento da banda de DNA em gel (MONTEIRO *et al.*, 1999). Eventualmente, a expressão, purificação, e uso do domínio C-terminal de NifA nesses mesmos ensaios confirmou ser este o domínio responsável pela interação com as seqüências promotoras (MONTEIRO *et al.*, 2003).

Um segundo trabalho importante avaliou a capacidade de o domínio GAF expresso *in trans* (resíduos 1-203 de NifA) inibir a atividade de $\Delta(1-203)$ NifA em *E. coli*; Monteiro e colaboradores (1999b) observaram que a coexpressão destes dois polipeptídeos permite reconstruir a inibição de NifA por amônio sob certas condições de expressão, sugerindo pela primeira vez um mecanismo para a inibição de NifA por seu domínio GAF: resíduos presentes no domínio GAF regulador interagiriam com resíduos dos domínios AAA+ e/ou C-terminal, impedindo que eles assumissem a conformação necessária para ativar a transcrição dos promotores-alvo. Esta hipótese foi reforçada por um trabalho subsequente que constatou a inibição da atividade ATPásica *in vitro* (e da ligação *in vitro* ao promotor *nifB*) da variante $\Delta(1-203)$ NifA pelo domínio GAF (resíduos 1-203) purificado separadamente (MONTEIRO *et al.*, 2001). O mesmo trabalho verificou alteração no padrão de proteólise de $\Delta(1-203)$ NifA incubada com GAF, sugerindo fortemente a ocorrência de uma interação específica entre os domínios de NifA.

O estudo da regulação da atividade de NifA também incluiu a busca pelo ativador responsável pela desrepressão de NifA em *H. seropedicae* em resposta a baixos níveis de amônio – uma resposta não observada em quando NifA é expressa em *E. coli*. As proteínas da família PII, que já se sabia estarem envolvidas na sinalização da concentração de amônio para NifA em γ -Proteobacteria, constituíam um dos alvos mais promissores. O trabalho de Noindorf e colaboradores (2011) mostrou que a deleção do gene *glnK* (mas não a do gene *glnB*) em *H. seropedicae* impede a fixação de nitrogênio neste organismo, e que o fenótipo selvagem pode ser reconstituído com a expressão de GlnK ou de $\Delta(1-203)$ NifA – a variante insensível a amônio – no mutante. Isso indicou que GlnK seria o ativador responsável pela ativação de NifA. O trabalho ainda mostrou que a expressão de GlnB a partir do promotor de *glnK* também resgatava o fenótipo selvagem no mutante *glnK*, sugerindo que a diferença funcional observada entre GlnB e GlnK na regulação da FBN deve-se mais ao nível de expressão de cada uma do que a diferenças intrínsecas entre as duas proteínas PII deste organismo.

O reconhecimento do ativador de NifA permitiu realizar novos experimentos para testar as condições de interação e ativação de NifA por PII. Oliveira *et al.* (2012) valeram-se de ensaios de proteólise limitada para observar a interação entre o domínio GAF (1-203) purificado e GlnK na presença de seus efetores ATP, ADP, e 2OG. Os resultados sugeriram

que (1) a proteína GlnK, quando presente, interage sempre com o domínio GAF, mesmo sob condições em que não promove a ativação de NifA; (2) a interação entre GAF e GlnK é mais forte quando GlnK não se encontra uridililada; (3) a interação de GAF com GlnK é pouco responsiva aos efetores de PII, ao passo que a de GAF com GlnK uridililada varia de muito forte (na presença de ATP e alta concentração de 2OG) a muito fraca (na presença de ATP e baixa concentração de 2OG).

Paralelamente, foram realizados estudos para tentar elucidar o mecanismo da inibição do domínio GAF sobre o restante de NifA. A construção de uma série de variantes de NifA contendo truncagens N-terminais progressivas ($\Delta(1-45)$, $\Delta(1-90)$, $\Delta(1-135)$, $\Delta(1-165)$, $\Delta(1-185)$, $\Delta(1-221)$, $\Delta(1-244)$) mostrou que a remoção dos primeiros 165 resíduos já basta para remover a inibição por amônio em *E. coli* e *H. seropedicae glnK* – indicando que os resíduos importantes para a inibição da atividade de NifA deveriam estar localizados entre os primeiros 165 resíduos da proteína (STEFANELLO, 2011). Ainda, a remoção dos primeiros 45 resíduos bastou para tornar as três primeiras variantes de NifA permanentemente inativas, mesmo quando expressas em *H. seropedicae* na presença de GlnK.

Aquino e colaboradores (2015) transferiram quatro mutações ativadoras encontradas em NifAs de *R. rubrum* e *S. meliloti*, e construíram outras oito variantes de NifA contendo substituições em resíduos conservados nas proteínas de α e β -Proteoobacteria. A avaliação da atividade dos mutantes revelou que todas as mutações inativaram NifA permanentemente, exceto G25E, que aliviou parcialmente a inibição de GAF sobre o domínio central sem remover totalmente a regulação por amônio.

Por fim, mais recentemente, foi adotado um sistema simples e eficiente para realizar a coexpressão de NifA e GlnK em *E. coli*, que permitiu detectar pela primeira vez atividade de NifA de *H. seropedicae* em um organismo não diazotrófico (STEFANELLO, 2014). De posse desta nova ferramenta, avaliou-se a capacidade de diferentes proteínas PII ativarem NifA. Conforme esperado, GlnB e GlnK de *H. seropedicae* e GlnB de *A. brasilense* ativaram NifA; embora NifA não seja ativa quando expressa em *E. coli*, GlnB de *E. coli* também revelou-se capaz de ativar NifA, indicando que a falta de atividade de NifA expressa heterologicamente deve ser consequência da baixa concentração de GlnB em *E. coli*. A proteína GlnZ de *A. brasilense* e uma proteína PII quimérica contendo os primeiros 48 resíduos de GlnZ não foram capazes de ativar NifA, sugerindo que os resíduos mais importantes para a ativação de NifA por PII encontram-se entre os primeiros 48. Um mutante de GlnK com a mutação G89A (caracterizada em *E. coli*, impede a ligação de ATP/ADP – JIANG, ZUCKER, e NINFA, 1997), e um mutante contendo a deleção do T-loop ($\Delta(45-54)$), também não ativaram NifA; um mutante Y51F, que não pode ser uridililado, ativou NifA mais

fracamente que GlnK selvagem. Disto concluiu-se que a interação de PII com ATP é essencial para a ativação de NifA, mas a uridililação é secundária (STEFANELLO, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos ao longo dos anos trouxeram avanços importantes para a compreensão do mecanismo de regulação de NifA e, por consequência, do controle da fixação biológica do nitrogênio em *H. seropedicae*; no entanto, muitos detalhes ainda não são compreendidos. Particularmente, os resíduos de aminoácidos em GlnK e NifA responsáveis pela interação entre as duas proteínas não são conhecidos, e não se tem dados que permitam ao menos deduzir as superfícies de interação entre ambas. Não se sabe também qual o efeito da interação de efetores de PII sobre a atividade de NifA, um passo importante na definição da regulação da proteína. Este trabalho buscou aprofundar o entendimento da regulação do sistema NifA-GlnK de *H. seropedicae* construindo mutantes pontuais de GlnK e aleatórios de GlnK e NifA.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi utilizar técnicas de clonagem molecular e expressão heteróloga de proteínas para localizar resíduos ou superfícies moleculares importantes para a ativação de NifA de *H. seropedicae* por proteínas PII, avaliar o efeito da interação de PII com seus efetores para a regulação da atividade de NifA e investigar o mecanismo da inibição do domínio GAF sobre o domínio central.

Especificamente, os objetivos foram:

- 3.1. Construir variantes de GlnK com as mutações K58M e Y51F (reconstrução; vide seção 5.1 *caput*), e avaliar sua capacidade de ativar NifA coexpressa em *E. coli*.
- 3.2. Caracterizar *in vitro* as variantes de GlnK Y51F, K58M, G89A, e $\Delta(45-54)$ para confirmar a presença do fenótipo esperado de interação com ATP e 2OG, modificação por uridililação, e correta estruturação secundária.
- 3.3. Construir uma biblioteca de mutantes aleatórios de GlnK, selecionando clones incapazes de ativar NifA, e avaliar a disposição e identidade das mutações para tentar localizar resíduos importantes para a ativação de NifA.
- 3.4. Construir variantes de NifA insensíveis a oxigênio, para facilitar a execução de experimentos de mutagênese aleatória.
- 3.5. Construir bibliotecas de mutantes aleatórios do domínio GAF de NifA que sejam inativos na presença de GlnK ou ativos na ausência de GlnK, e tentar localizar os resíduos essenciais para a ativação de NifA por PII e para a inibição constitutiva de GAF sobre NifA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

Os produtos químicos (etanol, componentes para meio de cultura, sais, brometo de etídeo, IPTG, Xgal, ONPG, ágar, agarose, dNTPs, antibióticos e outros) foram adquiridos de diversas companhias (Sigma-Aldrich, Merck, JT Baker, Thermo Scientific, USB). *Primers* foram adquiridos das empresas Integrated DNA Technologies (IDT) e MWG Operon. As enzimas de restrição e seus respectivos tampões foram comprados das empresas Thermo Scientific, Roche, e New England Biolabs (NEB), e usadas de acordo com as instruções do fabricante. Enzimas modificadoras (SAP, T4 DNA polimerase) foram obtidas das empresas USB ou Thermo Scientific. Taq DNA polimerase foi adquirida das empresas Thermo Scientific e Promega. Gases para troca gasosa foram comprados da empresa White-Martins. A água ultrapura foi produzida no laboratório com um equipamento Millipore MilliQ® Synthesis, e autoclavada antes do uso. Somente água ultrapura foi utilizada para manipulação de DNA e proteínas.

4.2. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram pesados e dissolvidos para soluções-estoque no solvente mais apropriado. Antibióticos dissolvidos em água foram filtrados através de um filtro de 0,22 µm (Millipore). As soluções de antibiótico foram adicionadas aos meios de cultivo nas concentrações especificadas na tabela abaixo:

TABELA 2 – ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Abreviatura	Solvente	Concentração utilizada em µg/mL (para <i>E. coli</i>)
Ampicilina	Ap	Água	250
Kanamicina	Km	Água	100
Tetraciclina	Tc	Etanol 70%	10
Cloranfenicol	Cm	Etanol 95%	30
Ácido Nalidíxico	Nal	NaOH 1 M	5

4.3. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

A tabela 3 contém a lista das bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho. Mapas dos vetores de clonagem pET28a, pET29a, pETDuet1 e pTZ57R podem ser encontrados nos anexos 1 a 4.

TABELA 3 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Bactérias				
<i>E. coli</i>	Resistência	Linhagem	Genótipo	Referência
TOP10	Sm	Derivada de <i>E. coli</i> MC1061	F ⁻ λ - <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i>	Invitrogen
JM109(λ DE3)	Nal	Derivada de <i>E. coli</i> DH1 (K12)	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> λ - Δ (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lacI</i> ^q Δ M15] λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺]	Origem incerta; derivada de JM109 (YANISCH-PERRON, VIEIRA e MESSING, 1985)
BL21(λ DE3)	-	Derivada de <i>E. coli</i> B834	F ⁻ <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺]	STUDIER e MOFFATT, 1986
Plasmídeos	Resistência	Ancestral	Característica	Referência
pET28a	Km	-	Vetor de expressão; permite a expressão de proteínas fusionadas a uma cauda de histidinas N-terminal a partir de um promotor <i>T7/lacO</i> .	Novagen
pET29a	Km	-	Vetor de expressão; permite a expressão de proteínas nativas ou fusionadas a uma cauda de histidinas C-terminal a partir de um promotor <i>T7/lacO</i> .	Novagen
pETDuet1	Ap	-	Vetor de expressão dual; permite a expressão de até duas proteínas, cada qual a partir de seu próprio promotor <i>T7/lacO</i> . Sítios de policlonagem denominados MCSI e MCSII.	Novagen
pTZ57R	Ap	-	Vetor de clonagem; permite seleção de clones contendo insertos através de triagem de atividade de β -	Thermo Scientific

			galactosidase. Usado para clonagem de produtos de PCR sem usar restrição (ver seção 4.7.13).	
pEMB200	Km	pET29a	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	BONATTO <i>et al.</i> , 2007
pETHsglnB	Km	pET28a	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET28a.	Marco Aurélio Schuler de Oliveira, não publicado.
pRL293	Km	pETNdeM-11	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado em pETNdeM-11.	Richard Little, não publicado.
pRT22	Cm	pWVC22	Contém a fusão traducional <i>nifH</i> (<i>K. pneumoniae</i>):: <i>lacZ</i> .	TULI e MERRICK, 1988
pYZ1	Ap	pT7-7	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pT7-7.	LITTLE <i>et al.</i> , 2000
pETN185	Km	pET28a	Contém a variante N185 de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonada <i>NdeI/BamHI</i> em pET28a.	STEFANELLO, 2011
pRAM1T7	Ap	pT7-7	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pT7-7.	STEFANELLO, 2011
DNifA	Ap	pETDuet1	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> <i>nifA</i> gene clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de pETDuet1.	STEFANELLO, 2014
DN185	Ap	pETDuet1	Contém a variante do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> <i>nifA</i> que codifica para $\Delta(1-185)$ NifA clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de pETDuet1.	STEFANELLO, 2014
DHsglnK	Ap	pETDuet1	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de pETDuet1.	STEFANELLO, 2014
HsglnKDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
pAASHsglnKG89A29	Km	pET29a	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com a substituição G89A clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	STEFANELLO, 2014
HsglnKG89ADNifA	Ap	DNifA	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição G89A clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014

pAASHdeltaTglnK29	Km	pET29a	Contém uma variante gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> que expressa GlnK com deleção dos resíduos 42-54 clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a..	
HdeltaTglnKDNifA	Ap	DNifA	Contém uma variante gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> que expressa GlnK com deleção dos resíduos 42-54 clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
AbdeltaTglnBDNifA	Ap	DNifA	Contém uma variante gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> que expressa GlnB com deleção dos resíduos 42-54 clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
AbdeltaTglnZDNifA	Ap	DNifA	Contém uma variante gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> que expressa GlnZ com deleção dos resíduos 42-54 clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
HsglnBDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
EcglnglnBDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>E. coli</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
AbglnBDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
AbglnZDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
AbΔTglnBDNifA	Ap	DNifA	Contém uma variante gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> que expressa GlnK com deleção dos resíduos 42-54 clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
AbΔTglnZDNifA	Ap	DNifA	Contém uma variante gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> que expressa GlnK com deleção dos resíduos 42-54 clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
AbB91ZDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene que codifica para uma protein quimérica	STEFANELLO, 2014

			contend os resíduos 1-91 de GlnB de <i>A. brasilense</i> e 92-112 de GlnZ do mesmo organismo clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	
AbZ48BDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene que codifica para uma protein quimérica contend os resíduos 1-48 de GlnZ de <i>A. brasilense</i> e 49-112 de GlnB do mesmo organismo clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	STEFANELLO, 2014
Dxho*	Ap	pETDuet1	Contém a uma inserção no sítio <i>XhoI</i> (CTTCGAG) de pETDuet1.	Este trabalho
Dxho*K	Ap	Dxho*	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de Dxho*.	Este trabalho
nifAxhoTZ	Ap	pTZ57R	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> com as mutações G570C, C573G, e C574A (<i>nifA[xho]</i>) clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pTZ57R.	Este trabalho
nifAxho29	Km	pET29a	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> com as mutações G570C, C573G, e C574A (<i>nifA[xho]</i>) clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
nifAxhoDxho*	Ap	Dxho*	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> com as mutações G570C, C573G, e C574A (<i>nifA[xho]</i>) clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de Dxho*.	Este trabalho
pR129	Km	pET28a	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET28a.	Este trabalho
pAASHsglnKY51FTZend	Ap	pTZ57R	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição Y51F e a região promotora de pET29a clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKY51F29end	Km	pET29a	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição Y51F clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
HsglnKY51FendDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição Y51F clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de	Este trabalho

			DNifA.	
pAASHsglnKK58MTZ	Ap	pTZ57R	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição K58M e a região promotora de pET29a clonado em pTZ57R.	Este trabalho
pAASHsglnKK58M29	Km	pET29a	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição K58M clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	
HsglnKK58MDNifA	Ap	DNifA	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição K58M clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCS1 de DNifA.	Este trabalho
pAAS1501	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a variante $\Delta(1-185)$ da quimera hs409-417av clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1502	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a variante $\Delta(1-185)$ da quimera hs412-420av clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1503	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a variante $\Delta(1-185)$ da quimera hs413-421av clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1504	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a variante $\Delta(1-185)$ da quimera hs414-422av clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1505	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a variante $\Delta(1-185)$ da quimera hs396-405av clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1506	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a variante $\Delta(1-185)$ da quimera hs404-412av clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1507	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a variante $\Delta(1-185)$ de NifA de <i>H. seropedicae</i> contendo a mutação C414H clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho

pAAS1508	Km	pET29a	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1509	Km	pET29a	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1516	Ap	DNifA	Contém o gene que codifica para GlnK de <i>H. seropedicae</i> com substituição H42Q clonado no MCSI de DNifA.	Este trabalho
pAAS1518	Ap	pET29a	Contém o gene que codifica a quimera hs409-417av clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1519	Ap	pET29a	Contém o gene que codifica a quimera hs412-420av clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1520	Ap	pET29a	Contém o gene que codifica a quimera hs413-421av clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1521	Ap	pET29a	Contém o gene que codifica a quimera hs414-422av clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1522	Ap	pET29a	Contém o gene que codifica a quimera hs396-405av clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1523	Ap	pET29a	Contém o gene que codifica a quimera hs404-412av clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1524	Ap	pET29a	Contém o gene que codifica a variante de NifA de <i>H. seropedicae</i> com a substituição C414H clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1525	Ap	DHsglnK	Contém o gene que codifica a quimera hs409-417av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DHsglnK.	Este trabalho
pAAS1526	Ap	DHsglnK	Contém o gene que codifica a quimera hs412-420av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DHsglnK.	Este trabalho
pAAS1527	Ap	DHsglnK	Contém o gene que codifica	Este trabalho

			a quimera hs413-421av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DHsglnK.	
pAAS1528	Ap	DHsglnK	Contém o gene que codifica a quimera hs414-422av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DHsglnK.	Este trabalho
pAAS1529	Ap	DHsglnK	Contém o gene que codifica a quimera hs396-405av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DHsglnK.	Este trabalho
pAAS1530	Ap	DHsglnK	Contém o gene que codifica a quimera hs404-412av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DHsglnK.	Este trabalho
pAAS1531	Ap	DHsglnK	Contém o gene que codifica a variante de NifA de <i>H. seropedicae</i> com a substituição C414H clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DHsglnK.	Este trabalho
pAAS1532	Ap	DNifA	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DNifA.	Este trabalho
pAAS1555	Ap	pETDuet1	Contém o gene que codifica GlnK de <i>H. seropedicae</i> com a substituição G89A clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de pETDuet1.	Este trabalho
pAAS1609	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a variante $\Delta(1-185)$ da quimera hs434-442av clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Este trabalho
pAAS1601	Ap	pAAS1555	Contém o gene que codifica a quimera hs409-417av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de DG89a.	Este trabalho
pAAS1602	Ap	pAAS1555	Contém o gene que codifica a quimera hs412-420av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de pAAS1555.	Este trabalho
pAAS1603	Ap	pAAS1555	Contém o gene que codifica a quimera hs413-421av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de pAAS1555.	Este trabalho
pAAS1604	Ap	pAAS1555	Contém o gene que codifica	Este trabalho

			a quimera hs414-422av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de pAAS1555.	
pAAS1605	Ap	pAAS1555	Contém o gene que codifica a quimera hs396-405av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de pAAS1555.	Este trabalho
pAAS1606	Ap	pAAS1555	Contém o gene que codifica a quimera hs404-412av clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de pAAS1555.	Este trabalho
pAAS1607	Ap	pAAS1555	Contém o gene que codifica a variante de NifA de <i>H. seropedicae</i> com a substituição C414H clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de pAAS1555.	Este trabalho
pAAS1613	Km	pET29a	Contém o gene que codifica a quimera hs409-417av[xhoI] clonado <i>NdeI/BamHI</i> in pET29a.	Este trabalho
pAAS1614	Ap	Dxho*K	Contém o gene que codifica a quimera hs409-417av[xhoI] clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de Dxho*K.	Este trabalho
pAAS1615	Ap	Dxho*	Contém o gene que codifica a quimera hs409-417av[xhoI] clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de Dxho*.	Este trabalho
pAAS1632	Km	pET28a	Contém o gene que codifica a quimera hs409-417av[xhoI] clonado <i>NdeI/BamHI</i> in pET28a (expressando his-hs409-417av).	Este trabalho
pAAS1637	Ap	Dxho*K	Contém o gene que codifica a quimera his-hs409-417av[xhoI] clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de Dxho*K.	Este trabalho

4.4. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Todos os meios de cultura foram preparados no laboratório e esterilizados por autoclavação antes do uso.

O meio LB (*Lysogeny Broth*¹⁴) foi preparado de acordo com Miller 1972; a composição final do meio é mostrada abaixo:

LB

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

O meio LA (*Lysogeny Agar*) foi preparado adicionando-se 1,5 g/L de ágar ao meio LB.

O meio SOB (*Super Optimal Broth*) foi preparado segundo Warren (2011), apresentando a seguinte composição:

SOB

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

O meio SOC (*Super Optimal Broth with Carbohydrate*) foi obtido através da adição de 2% (m/v) de glucose ao meio SOB.

Para os ensaios de medição de atividade de β -galactosidase em *E. coli*, foi empregado o meio mínimo NFDM (CANNON *et al.*, 1974) suplementado com 0,02% de casamino ácidos. A este meio foram adicionados zero ou 20 mM de NH_4Cl e 0, 5, ou 500 μM de IPTG, dependendo das condições do ensaio. A composição deste meio é mostrada abaixo:

¹⁴“The acronym has been variously interpreted, perhaps flatteringly, but incorrectly, as *Luria broth*, *Lennox broth*, or *Luria-Bertani medium*. For the historical record, the abbreviation LB was intended to stand for „*lysogeny broth*” – BERTANI, 2004.

NFDM

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

Os sais de fosfato (K₂HPO₄ e KH₂PO₄) foram preparados como uma solução à parte 20 vezes concentrada, e a glucose foi preparada separadamente em uma solução a 200 g/L; a mistura de fosfatos e a glucose foram adicionados ao meio NFDM na hora do uso. O meio NFDM sólido foi feito com a adição de 1,5 g/L de ágar ao meio NFDM líquido.

4.5. MANIPULAÇÃO DE MICRORGANISMOS

4.5.1. Cultivo regular de *E. coli*

O cultivo de *E. coli* em meio líquido foi realizado rotineiramente a 37°C e 180 rpm em frascos de vidro cilíndricos ou cônicos contendo meio LB (ou outro meio específico, mencionado na descrição do experimento). Cultivos em pequena escala foram realizados em frascos cilíndricos de 20 mL contendo 3 mL de meio de cultivo; culturas em larga escala foram feitas em frascos cônicos (erlenmeyer) de 250-2000 mL contendo entre 100 e 400 mL de meio, evitando exceder a proporção 1:5 entre quantidade total de meio de cultivo e volume nominal do frasco.

Estoques das linhagens de *E. coli* foram feitos através da centrifugação de 1 mL de cultura saturada em meio líquido e adição de 500 µL de glicerol 50% ao pellet celular; estes estoques foram mantidos a -20°C e utilizados como fonte de células para iniciar culturas em meio líquido ou meio sólido.

O cultivo de *E. coli* em meio sólido foi feito em placas de Petri descartáveis contendo meio LA e os antibióticos necessários. Usualmente, as placas foram incubadas a 37°C por 12-16 horas para garantir o crescimento adequado das colônias; em alguns casos (durante a triagem de fenótipo branco/azul de células contendo pRT22 e plaqueadas em LA contendo Xgal), as placas foram mantidas a 30°C por 24 horas. Placas contendo colônias suficientemente crescidas foram preservadas a 4°C por até dois meses.

4.5.2. Preparo de *E. coli* quimiocompetente e termotransformação

Dois métodos de preparo de célula quimiocompetente foram empregados para transformação de plasmídeos em *E. coli*.

Para transformações rotineiras, empregou-se o método descrito por Chung e colaboradores (1989) com poucas modificações. Um pré-inóculo de *E. coli* em meio LB foi

cultivado a 37°C e 180 rpm durante a noite, até saturação. Cem microlitros dessa cultura foram re-inoculados em 10 mL de meio LB em um frasco cilíndrico de 50 mL, perfazendo o inóculo definitivo. Esse inóculo foi cultivado a 37°C e 180 rpm por ~2 h até $DO_{600nm} \sim 0,3$ (medido com caminho óptico $l = 1$ cm), sendo então realizada a centrifugação de alíquotas de 1 mL de cultura por 1 min a 10000 x g . O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 μ L de TSS (50 mM $MgCl_2$, 10% PEG8000, 5% DMSO em LB) gelado e mantidas em gelo até o momento do uso. A transformação foi feita através da adição de 0,5 μ L de plasmídeo íntegro ou 3-5 μ L de reação de ligação às alíquotas de célula competente, seguida de 30 minutos de incubação no gelo, adição de 400 μ L de meio SOC, e incubação por 60 minutos a 37°C. Após isso, as células foram plaqueadas em LA + antibióticos.

Para as transformações que necessitassem de maior eficiência, empregou-se o método de Inoue, Nojima e Okayama (1990) com poucas modificações. Um pré-inóculo de *E. coli* em meio LB foi cultivado a 37°C 180 rpm durante a noite, até saturação. Um mililitro dessa cultura foi re-inoculado em 100 mL de meio SOB em um frasco cilíndrico de 500 mL, perfazendo o inóculo definitivo. Esse inóculo foi cultivado a 20°C 180 rpm por ~24h até $DO_{600nm} \sim 0,6$ ($l=1$ cm). A cultura foi então centrifugada por 10 min a 5000 rpm e o pellet celular foi ressuspensado em 50 mL de solução de transformação TS (10 mM HEPES-KOH pH 6,7, 55 mM $MnCl_2$, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl). As células foram novamente colhidas por centrifugação, e ressuspensas em 10 mL de solução TS acrescida de 700 μ L de DMSO. Alíquotas de 1 mL foram estocadas a -70°C para uso posterior. A transformação foi feita através da adição de 1-5 μ L de reação de ligação a alíquotas de 100 μ L de célula competente, seguida de choque térmico a 42°C por 30s, incubação por 2 minutos no gelo, adição de 900 μ L de meio SOC, e incubação por 60 minutos a 37°C. Após isso, as células foram plaqueadas em LA contendo antibióticos.

4.5.3. Preparo de *E. coli* eletrocompetente e transformação

Ligações de difícil transformação ou com necessidade de recuperação de alto número de transformantes foram introduzidos em *E. coli* através de eletroporação. O protocolo utilizado é baseado nos que foram descritos na literatura (SAMBROOK *et al.*, 1989; DOWER, MILLER e RAGSDALE, 1988; TAKETO, 1988). Células de *E. coli* foram cultivadas a 37°C e 180 rpm em meio LB até a fase estacionária. Um mililitro dessa cultura foi re-inoculado em 100 mL de meio SOB em um frasco cônico de 500 mL, e incubado a 30°C e 180 rpm até DO_{600nm} entre 0,5 e 0,8 ($l=1$ cm). A cultura foi então resfriada no gelo por 30 minutos, centrifugada a 5000 x g por 5 minutos, e o pellet celular foi lavado duas vezes com 50 mL de água MilliQ estéril e uma vez com 50 mL de glicerol 10% estéril. Ao final da última lavagem, as células foram ressuspensas em cerca de 400 μ L de glicerol 10%, e

transferidas para tubos eppendorf estéreis contendo alíquotas de 100 µL de suspensão celular. As células preparadas foram estocadas a -70°C até o momento do uso. Para aumentar a eficiência da transformação, as ligações foram dessalinizadas por diálise em gota (MARUSIK e SERGEANT, 1980) através de membranas MilliporeSigma VSWP02500 (Millipore). A transformação foi feita mediante adição de 1-3 µL de ligação dessalinizada a 100 µL de célula competente, transferência da mistura para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad, cubeta de 0,2 cm – cat. no.165-2086), e aplicação de um pulso elétricos sob uma diferença de potencial de 2,5 kV com o aparelho Gene Pulser II® (Bio-Rad). Após o choque, adicionou-se 0,9 mL de meio SOC à cultura, e transferiu-se as células para um frasco de estéril 10 mL para incubação a 37°C por 60 minutos. Após isso, as células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos apropriados.

4.5.4. Determinação de atividade de β-galactosidase em *E. coli*

Para os experimentos de determinação de atividade de β-galactosidase, células de *E. coli* JM109(λDE3) contendo o plasmídeo pRT22 (fusão traducional *nifH::lacZ*) e os plasmídeos codificantes para as variantes de NifA e/ou PII foram inicialmente cultivadas em meio LB contendo os antibióticos apropriados a 37°C 180 rpm até saturação. Após esse período, 50 µL de cada cultura foram transferidos para 3 mL de meio NFDM suplementado com 20 mM NH₄Cl e 3% de LB, mais os antibióticos necessários. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após este período, as células foram colhidas por centrifugação a 5000 x *g* por 5 min, lavadas com meio NFDM (não suplementado), e diluídas para DO_{600nm} inicial de 0,2 (medido com caminho óptico *l* = 1 cm) em 4 mL de meio NFDM suplementado com 0,02% de casaminoácidos e com adição de IPTG (0, 5 µM ou 5 mM) e NH₄Cl (0 ou 20 mM). Para os experimentos realizados sob atmosfera anóxica, os frascos foram selados com rolhas de borracha e submetidos a troca de ar por gás nitrogênio por 30 minutos. As células foram incubadas por 6 h a 30°C e 180 rpm antes da determinação da atividade enzimática.

O ensaio de atividade da β-galactosidase foi realizado conforme descrito por Miller (1972), com poucas modificações. Cem microlitros de cada cultura foram adicionados a 900 µL de tampão Z (8,53 g/L Na₂HPO₄ anidro, 3,085 g/L NaH₂PO₄.H₂O, 0,75 g/L KCl, 0,246 g/L MgSO₄.7H₂O, 390 µL/L β-mercaptoetanol, 270 µL SDS 10%/L). Uma gota (~5 µL) de clorofórmio foi adicionada a cada tubo, e as amostras foram homogeneizadas brevemente para permeabilização celular e conseqüente liberação da enzima β-galactosidase no tampão de reação. Os tubos foram incubados a 30°C em banho-maria e a reação foi iniciada com a adição de 200 µL de orto-nitrofenil-β-galactosídeo (ONPG) a 4 mg/mL. Após 5-30 minutos, as reações foram paradas com 500 µL Na₂CO₃ 1M. A produção de ortonitrofenil (produto da degradação do ONPG) e a quantidade de restos celulares no meio de reação foram

quantificadas por espectrofotometria (absorbância a 415 nm e 550 nm, repectivamente) em um leitor de microplaca ELx800 (BioTek – caminho óptico l~6 mm) ou Promega Glomax Multi Detection System. A densidade óptica das culturas foi medida a 595nm nos mesmos equipamentos, e a atividade de β -galactosidase foi calculada segundo a equação:

$$\frac{1000(D0415 - 1,75(D0550))}{(\text{volume})(D0595)(\text{tempo de reação})}$$

A atividade foi expressa em unidades Miller, definidas pela equação acima.

4.5.5. Expressão de GlnK para purificação

Células de *E. coli* BL21(λ DE3) foram transformadas com os plasmídeos adequados (pETHsglnB, pEMB200, pAASHsglnKK58M29, pAASHsglnKG89A29, e pAASHdeltaTglnK29 – codificando para hsGlnB, hsGlnK, hsGlnK K58M, hsGlnK G89A, e hsGlnK Δ (45-54), respectivamente). A expressão das proteínas foi realizada em 200 mL de meio LB contendo 20 mM NH_4Cl (para garantir que as proteínas PII produzidas não sofressem uridililação *in vivo* (MOURE *et al.*, 2011)) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina. As células foram cultivadas a 37°C 180 rpm por cerca de 3 horas até DO600 ~0,6. Nesse momento, adicionou-se 0,5 mM de IPTG às culturas para induzir a expressão a partir dos promotores *T7/lacO*. A expressão ocorreu por 3 horas a 30°C, findas as quais as células foram colhidas por centrifugação e armazenadas a -20°C até o momento da purificação.

4.5.6. Expressão de his-hs409-417av[xhoI] para purificação

Células de *E. coli* JM109(λ DE3) pRT22 foram transformadas com o plasmídeo adequado pAAS1637 (codifica his-hs409-417av e hsGlnK). A expressão das proteínas foi realizada em um frasco cônico de 2 L contendo 500 mL de meio LB e 125 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. As células foram cultivadas a 37°C 180 rpm por cerca de 3 horas até DO600 ~0,45. Após esse período, a cultura foi resfriada em um banho de água à temperatura ambiente e adicionou-se ampicilina e 20 μM de IPTG para induzir a expressão a partir dos promotores *T7/lacO*. A cultura foi então incubada a 18°C 250 rpm por 18 horas, findas as quais as células foram colhidas por centrifugação e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para ensaios de expressão e solubilidade, as células foram cultivadas em 5 mL de meio LB com ampicilina 250 $\mu\text{g/mL}$ por cerca de 3 horas a 37°C e 180 rpm até DO_{600nm} ~0,6, momento em que se adicionou diferentes concentrações de IPTG às culturas para permitir a expressão das proteínas pelas 3 horas subseqüentes a 30°C. As células foram colhidas por centrifugação e guardadas a -20°C até a hora do uso.

4.6. FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

4.6.1. Edição e análise de seqüências

Seqüências de DNA foram visualizadas e manipuladas com os programas BioEdit 7.0.5 (HALL, 1999), SnapGene Viewer (GSL Biotech), e MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011). O programa MEGA5 foi preferido para a realização de alinhamentos locais, ao passo que o programa BioEdit foi preferencialmente utilizado para a localização de sítios de restrição nas seqüências-alvo. Eventuais figuras foram preparadas com o programa BioEdit ou com o programa Jalview 2.10 (WAREHOUSE *et al.*, 2009), conforme a conveniência.

Para a escolha de um sítio de restrição específico a ser inserido no gene *nifA* de *H. seropedicae* sem alteração dos resíduos de aminoácidos codificados (ou seja, exclusivamente através de mutações silenciosas), utilizou-se a ferramenta WatCut (Michael Palmer, University of Waterloo – disponível em <http://watcut.uwaterloo.ca/template.php>).

4.6.2. Bases de dados

A busca por seqüências conhecidas de genes homólogos a *nifA* e PII foi realizada através dos bancos de dados do NCBI e do KEGG (KANEHISA *et al.*, 2017). As seqüências foram obtidas em formato FASTA para a utilização em alinhamentos subseqüentes. Estruturas de proteínas PII ou de domínios GAF para modelagem estrutural foram recuperadas do Protein Data Bank (PDB – www.rcsb.org, BERMAN *et al.*, 2000).

4.6.3. Alinhamento de seqüências

Os alinhamentos de proteínas NifA e de proteínas PII foram realizados no programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011) usando o algoritmo ClustalW (CHENNA *et al.*, 2003). Manteve-se os parâmetros *default* (matriz Gonnet, *residue-specific penalty* ON, *hydrophilic penalty* ON, *gap separation distance* 4), exceto pelas penalidades para abertura e extensão de *gaps*: estas foram determinadas como valores muito altos (1000) para desestimular ao máximo a inserção de *gaps* nas seqüências.

4.6.4. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os *primers* foram desenhados com o auxílio da ferramenta OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>), buscando manter as temperaturas de anelamento (T_m) entre 50 e 60°C e minimizar a presença de estruturas secundárias ou de homodimerização envolvendo os terminais 3'. Sítios de restrição foram introduzidos nas seqüências de alguns dos *primers* para facilitar os procedimentos de clonagem. Os *primers* projetados estão listados abaixo, com os sítios de restrição

sublinhados; a temperatura de fusão foi calculada com a ferramenta OligoAnalyzer (IDT). Os *primers* estão listados na tabela 4.

TABELA 4 – PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Primer	Seqüência	Temperatura de anelamento (°C)	Finalidade
M13 universal	GTAAAACGACGGCCAG	50,7	Seqüenciamento
M13 reverso	CAGGAAACAGCTATGAC	47,0	Seqüenciamento
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	47,5	Seqüenciamento
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	53,4	Seqüenciamento
pET upstream	ATGCGTCCGGCGTAGA	54,3	Seqüenciamento
N185-RAM	CAGCAGCTGCATATGGAAAAG	57,9	Seqüenciamento
T7F grd	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTAT	59,8	Amplificação de DNA
T7term grd	GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	57,8	Amplificação de DNA
pET28aKpn rev2 (K-B-S-S)	GTCGACGGAGCTT <u>GGATCCGGTACC</u>	64,5	Introdução de sítio <i>KpnI</i> C-terminal
nifAXhoI fwd	CCAGCT <u>CTCGAGG</u> CAACTCCAG	61,8	Introdução de sítio <i>XhoI</i> em <i>nifA</i> por meio de mutações silenciosas
nifAXhoI rev	CTGGAGTTGC <u>CTCGAG</u> AGCTGG	61,8	Introdução de sítio <i>XhoI</i> em <i>nifA</i> por meio de mutações silenciosas
hs409+417av fwd	CAGGCCATGAAGCTGCTGATGAGC	62,5	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs409+417av rev	GCTCATCAGCAGCTTCATGGCCTG	62,5	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs412+420av fwd	AAGGTCATGATGAGCCACCGCT	61,1	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs412+420av rev	AGCGGTGGCTCATCATGACCT T	61,1	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs413+421av fwd	GTCATGATGAATCACCGCTGGCC	60,6	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs413+421av rev	GGCCAGCGGTGATTCATCATGAC	60,6	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>

hs414+422av fwd	ATGATGAATTGCCGCTGGCCG	61,1	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs414+422av rev	CGGCCAGCGGCAATTCATCAT	61,1	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hsNCY-SHR fwd	CCTGGAGCGCACTGCCACCAT	65	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hsNCY-SHR rev	GCGCTCCAGGCAATTTTCCAGTTC	65	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hsnifA C414H fwd	TCATGATGAATCACTACTGGCCGG	58,7	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hsnifA C414H rev	CCGGCCAGTAGTGATTCATCATGA	58,7	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs396+405av fwd	GTGGAGAACGGCCGCCCG	64,7	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs396+405av rev	CGGGCGGCCGTTCTCCAC	64,7	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs404+412av fwd	GCCATGTCAGACAGCGCCAT	60,8	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs404+412av rev	ATGGCGCTGTCTGACATGGC	60,8	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs434+442av fwd	CACCATGATGGAGGACGGCA	59,8	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hs434+442av rev	TGCCGTCCTCCATCATGGTG	59,8	Construção de quimeras de <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> e <i>A. vinelandii</i>
hsglnK H42Q fwd	CAGAAGGGCCAAACCGAACTC	58,5	Construção de mutante pontual de <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>
hsglnK H42Q rev	GAGTTCGGTTTGGCCCTTCTG	58,5	Construção de mutante pontual de

			<i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>
			Construção de mutante pontual de <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>
GlnKY51R	CGACCACGAATTCCGCGCCGC	71,7	
			Construção de mutante pontual de <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>
GlnKY51F	GCGGCGCGGAATTCGTGGTCG	71,7	
			Construção de mutante pontual de <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>
hsGlnK K58M f	CTGCCCCATGACCAAGAT	51,9	
			Construção de mutante pontual de <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i>
hsGlnK K58M r	ATCTTGGTCATGGGCAG	51,9	

4.6.5. Predição de estrutura secundária e modelagem estrutural

A predição de estrutura secundária da proteína NifA de *H. seropedicae* foi feita através dos programas JPred 4 (DROZDETSKIY *et al.*, 2015), GOR4 (GIBRAT *et al.*, 1987 – disponível em <https://npsa-prabi.ibcp.fr/>), PSIPRED (Buchan *et al.*, 2013), e CFSSP (ASHOK KUMAR, 2013).

A modelagem estrutural da mesma proteína foi realizada no servidor SWISS-MODEL (BIASINI *et al.*, 2014), uma ferramenta integrada que realiza a busca por proteínas com seqüência de estrutura secundária semelhante à da seqüência-alvo no Protein Data Bank (BERMAN *et al.*, 2000) usando os algoritmos BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e HHblits (REMMERT *et al.*, 2012), e realiza a construção de modelos estruturais com o algoritmo ProMod3, derivado do OpenStructure (BIASINI *et al.*, 2013). A qualidade dos modelos é avaliada pelo próprio SWISS-MODEL usando o programa QMEAN (BENKERT, KUNZLI, e SCHWEDE, 2009).

4.6.6. Construção de árvore de distância evolutiva

Árvores filogenéticas foram construídas pelo método de *neighbor-joining* (SAITOU e NEI, 1987) utilizando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011) nas condições *default* (*Poisson model, uniform rate of substitution among sites, deletion of gaps/missing data*), com o grau de suporte de cada ramo avaliado por *bootstrap* (EFRON, 1987) com 1000 iterações.

4.6.7. Cálculo de propriedades físico-químicas de proteínas

Parâmetros físico-químicos de his-hs409-417av[xhoI] (uma variante quimérica de NifA usada em ensaios de purificação) – massa molecular, ponto isoelétrico teórico,

coeficiente de extinção molar – foram calculados com o auxílio da ferramenta ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005).

4.6.8. Visualização de estruturas tridimensionais de proteínas

A visualização de estruturas de proteínas foi realizada no software PyMOL Molecular Graphics System 1.2r3pre (DeLano Scientific). Todas as imagens de estruturas tridimensionais incluídas neste trabalho foram geradas com este programa.

4.6.9. Quantificação relativa de proteínas por densitometria

Imagens obtidas após a separação eletroforética de proteínas foram analisadas com o software GelQuantNET (BiochemLabSolutions) para medir a densidade relativa de cada banda de interesse presente nas amostras analisadas; a densidade da banda permite estimar a proporção da proteína ali presente no volume total da amostra.

4.7. MANIPULAÇÃO DO DNA

4.7.1. Análise eletroforética de DNA

Os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão BE (5 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0,5 mM EDTA – baseado no meio eletroforético melhorado descrito em BRODY e KERN, 2004). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a 60-80 V por 40-60 minutos; após isso, o gel foi incubado em uma solução de brometo de etídeo (0,002% m/v em água) por 15 minutos para coloração das bandas de DNA, e visualizado sob luz UVC (254 nm). As imagens foram capturadas em um aparelho 3UV™ Transilluminator (UVP). Para a estimativa dos tamanhos moleculares dos fragmentos, utilizou-se amostras de DNA de tamanhos conhecidos (padrões de tamanho molecular) adquiridos das empresas Thermo Scientific (1 kb e 100 bp, cat. no. SM0311 e 15628019, respectivamente) e NEB (2-log DNA Ladder, cat. no. N3200S).

4.7.2. Purificação de fragmentos de DNA

Fragmentos de DNA obtidos por amplificação ou por restrição foram rotineiramente empregados nas etapas subsequentes do trabalho sem qualquer procedimento de purificação. Nas situações em que se fez necessário purificar o DNA para remoção de componentes da solução tampão ou de fragmentos de DNA indesejados, optou-se por utilizar os kits comerciais de purificação de DNA QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) ou Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Protocol (Promega).

Quando foi necessário separar dois ou mais fragmentos de tamanho molecular diferente presentes em na mesma solução, optou-se por realizar a separação eletroforética do DNA em gel de agarose 1% sob baixa diferença de potencial (60 - 80 V) por 1-2 h. O gel

então corado com brometo de etídeo, como já descrito, e visualizado sob luz UVB (302 nm) em um transluminador 3UV™ Transilluminator (UVP). As bandas de interesse foram recortadas do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e o DNA foi extraído da agarose usando algum dos kits de purificação supramencionados, seguindo as instruções do fabricante.

4.7.3. Amplificação de DNA

A amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada rotineiramente com Taq DNA polimerase obtida de diferentes fabricantes (Thermo Scientific, Promega), de acordo com as respectivas instruções. Os sistemas de reação tipicamente continham 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 200 nM de cada *primer*, 100-500 ng de DNA molde e 1 U de Taq DNA polimerase, em um volume final de 10 a 25 µL, conforme a necessidade.

O programa de amplificação tipicamente seguiu o protocolo de uma etapa inicial de desnaturação (95°C, 5 min) seguida de 25 ciclos de amplificação (95°C 30 s, 50-65°C 30 s, 72°C 30 s 2 min) e uma etapa de extensão final (72°C, 20 min). A temperatura de anelamento escolhida variou entre 50 e 65°C, conforme a temperatura de anelamento calculada para cada *primer*; em caso de amplificações difíceis, optou-se por realizar um gradiente de temperatura (geralmente entre 50-60°C). O tempo de extensão a 72°C em cada ciclo foi dependente do tamanho do fragmento a ser amplificado (1 minuto por 1000 bases).

4.7.4. Amplificação mutagênica de DNA

As reações de amplificação mutagênica aleatória do DNA foram realizadas com o sistema GoTaq Green Master Mix (Promega), em sistemas de reação de 50 a 100 µL aos quais adicionou-se 200 nM de cada *primer*, 100-500 ng de DNA molde, e 3 mM de MgCl₂ – elevando a concentração final de Mg²⁺ no sistema para 4,5 mM, de modo a aumentar ligeiramente a taxa de mutação (ECKERT e KUNKEL, 1991).

4.7.5. Mutagênese sítio dirigida por OE-PCR

Mutantes pontuais em sítios específicos foram obtidos de acordo com a estratégia de mutagênese dirigida por oligonucleotídeos (HO *et al.*, 1989), uma variante da técnica de *overlap extension* PCR (OE-PCR). A técnica emprega um par de *primers* complementares à região do DNA que se pretende mutagenisar; estes *primers* contêm um (ou mais) diferenças em relação à sequência do gene e introduzem mutações no sítio desejado, de acordo com o delineado na figura 11A.

Os genes-alvo foram amplificados inicialmente, cada um, com dois conjuntos de *primers* separados: um *primer* complementar à região 5' com um *primer* mutagênico 3', e um *primer* mutagênico 5' (complementar ao *primer* mutagênico 5') com um *primer* 3'. Os dois produtos de PCR, complementares na região contendo a mutação introduzida, foram então misturados e usados como molde para uma nova reação de amplificação usando os *primers* 5' e 3' não-mutagênicos. O produto dessa segunda PCR contém a mutação desejada no gene íntegro.

O mesmo procedimento (OE-PCR) foi usado para a junção de fragmentos de PCR oriundos de genes distintos, conforme descrito por Higuchi, Krummel, e Saki (1988) e ilustrado na figura 11B. Neste caso, cada par de *primers* mutagênicos era perfeitamente complementar entre si e continha metade da seqüência advinda de cada um dos fragmentos que se pretendeu juntar.

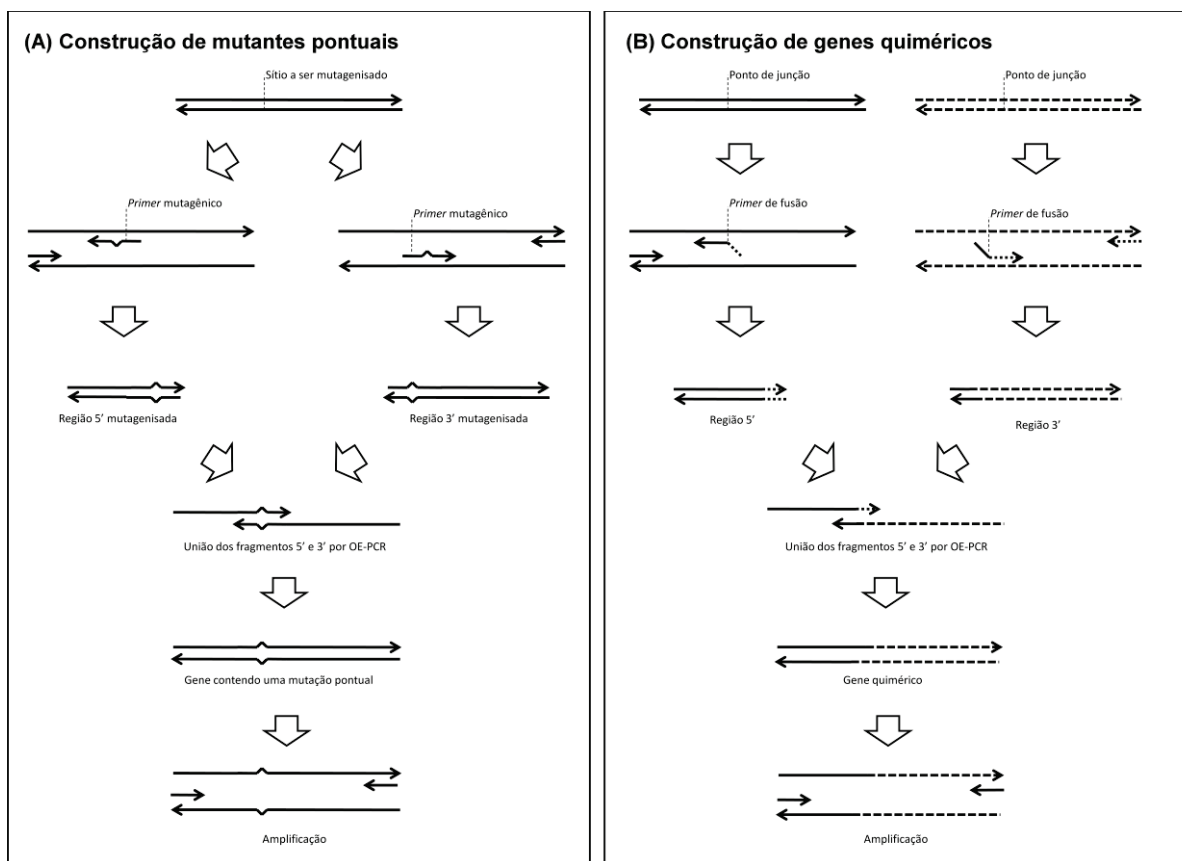


Figura 11 - Representação esquemática do uso de OE-PCR para a geração de genes contendo mutações pontuais (A) e para a construção de genes quiméricos (B).

Nos dois casos, a técnica consiste de duas etapas de PCR: na primeira, dois fragmentos do gene são amplificados separadamente, usando *primers* mutagênicos complementares ao gene, porém com a substituição desejada (A), ou *primers* contendo metade da seqüência complementar a cada um dos genes alvo (B). Na segunda etapa, os fragmentos são misturados e amplificados com os *primers* 5' e 3' para produção de um gene inteiro contendo a mutação desejada (A) ou a fusão das duas regiões gênicas (B).

4.7.6. Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento dos insertos dos plasmídeos foi feito pelo método de Sanger *et al.* (1977), usando dideoxiribonucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluorescência (PROBER *et al.*, 1987), empregando reativos comercialmente disponíveis. A reação de seqüenciamento foi feita com o reativo BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies), e incubada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems). Os reagentes presentes em cada sistema estão listados na tabela 5.

TABELA 5 – SISTEMA DE REAÇÃO PARA SEQÜENCIAMENTO DE DNA

Reagente	Quantidade (µL)
Sequencing buffer 5x	2
Sequencing mix BigDye Terminator v3.1	1
Primer	0,5
DNA plamidial	0,5
Água ultrapura	6

O programa utilizado para a reação de seqüenciamento foi 96°C 1 min, 40 ciclos de extensão (96°C 15 s, 50°C 15 s, 60°C 4 min), e extensão final de 60°C 1 min.

Os produtos de cada reação foram precipitados através da adição de 10 µL de água, 2 µL acetato de amônio 4 M e 65 µL de etanol 96%, lavados com 100 µL de etanol 70%, secados, ressuspensos em tampão de corrida (Life Technologies) e analisados em um seqüenciador ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.7.7. Digestão com endonucleases de restrição

As digestões de DNA para clonagem gênica foram feitas em sistemas de 10-50 µL contendo 2 a 10 unidades de enzima durante 4 h ou 24 h a 37°C, conforme a eficiência da digestão. Todas as enzimas foram adquiridas de empresas de biotecnologia (Roche, Thermo Scientific, NEB) e usadas em tampões adquiridos das mesmas companhias. Restrições com duas endonucleases diferentes foram feitas simultaneamente ou seqüencialmente (no caso de restrições envolvendo *NdeI*) no mesmo sistema de reação, usando o tampão mais favorável à atividade de ambas as enzimas. Após a incubação, os sistemas foram aquecidos a 80-90 °C por 20 minutos para inativar as enzimas termossensíveis. Quando se trabalhou com enzimas resistentes ao calor, foi realizada a purificação dos fragmentos de DNA após a restrição de acordo com o previamente descrito (item 4.7.2, p. 88). O tampão utilizado em cada digestão foi escolhido conforme a recomendação do fabricante (Thermo Scientific, Roche, ou NEB).

Digestões de DNA executadas apenas para confirmação de padrões de restrição (usualmente na seleção de plasmídeos recombinantes) foram feitas em sistemas de 5 µL contendo 0,5 unidades de cada enzima, segundo a tabela abaixo:

TABELA 6 – SISTEMAS DE RESTRIÇÃO

Componente	Quantidade		
	Sistema de 50 µL	Sistema de 10 µL	Sistema de 5 µL
DNA (50 ng/µL – 1 µg/µL)	25 µL (1,2 - 25 µg)	3 µL (150 ng - 3 µg)	1,5 µL (75 ng - 1,5 µg)
Tampão 10x	5 µL	1 µL	0,5 µL
Enzima 1	1 µL (10 U)	0,3 µL (3 U)	0,15 µL
Enzima 2	1 µL (10 U)	0,3 µL (3 U)	0,15 µL
Água ultrapura	18 µL	5,4 µL	2,7 µL

4.7.8. Geração de pontas cegas

Reações para geração de pontas cegas foram feitas usando T4 DNA polimerase (Thermo Scientific), seguindo o protocolo do fabricante em tudo, com exceção do volume total do sistema (sistemas de 100 µL foram reduzidos para 20 µL).

4.7.9. Ligação de fragmentos de DNA

As reações de ligação foram feitas em sistemas de 10 µL contendo 0,3 unidades Weiss de T4 DNA ligase, nos quais inserto e vetor foram adicionados com razão molar de aproximadamente 3:1 entre as pontas de cada fragmento, respectivamente. Geralmente, isso representou cerca de 1 µL de inserto para 0,2-0,5 µL de vetor. Os sistemas foram preparados de acordo com a recomendação do fabricante (Fermentas), incubados a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos, e então transformados em *E. coli*.

4.7.10. Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método da lise alcalina (BIRNBOIM e DOLLY, 1979; SAMBROOK *et al.*, 1989), com algumas modificações. Células de *E. coli* foram cultivadas em 3 mL de meio LB com antibióticos sob agitação até a saturação. A cultura foi então submetida a centrifugação a 13000 x *g* por 1 minuto para separar as células do meio de cultura. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 150 µL de solução tampão GET (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 9 g/L glucose, 10 mM EDTA) gelada. As células foram rompidas com a adição de 150 µL de solução de lise (200 mM NaOH, 1% (m/v) SDS) e homogeneização manual por cerca de um minuto; em seguida, o sistema foi neutralizado com a adição de 150 µL de solução Kacf (3 M CH₃COOK, 1,8 M HCOOH, pH 4,8) e homogeneizado delicadamente para causar a precipitação de proteínas e DNA genômico. Após a verificação da precipitação, adicionou-se 100 µL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) ao sistema, e procedeu-se a uma rápida homogeneização com o intuito de

provocar a desnaturação e agregação de proteínas ainda em solução. A mistura foi então centrifugada a 13000 x *g* por 5 minutos para a separação das fases orgânica (inferior) e aquosa (superior). A fase aquosa (400 µL) foi transferida para um novo tubo eppendorf, e o DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 800 µL de etanol 96%. O precipitado foi separado por centrifugação a 13000 x *g* por 10 minutos; o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. O precipitado foi então novamente centrifugado a 13000 x *g* por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o pellet de DNA foi secado sob vácuo. Para uso em experimentos subsequentes, o DNA extraído foi comumente ressuspensionado em 30 µL de água ultrapura.

4.7.11. Seleção de plasmídeos recombinantes

A seleção de plasmídeos recombinantes foi realizada por dois métodos distintos, de acordo com o que fosse mais prático executar para cada construção.

Preferencialmente, empregou-se a seleção de recombinantes por PCR de colônia. Por este método, uma amostra de cada uma das colônias de *E. coli* em meio sólido contendo possíveis plasmídeos recombinantes foi utilizada com DNA molde para uma reação de PCR com *primers* que reconheçam regiões no plasmídeo-alvo a montante e à jusante do sítio de ligação. Os pares de *primers* utilizados foram M13 universal/M13 reverso (para seleção de clones em pTZ57R) T7 promotor/T7 terminator (para seleção de clones em pET28a, pET29a, e pT7-7), pET upstream/DuetDOWN1 (para seleção de clones no sítio de policlonagem I de pETDuet1 e derivados), e DuetUP2/T7 terminator (para seleção de clones no sítio de policlonagem II de pETDuet1 e derivados). A detecção de uma banda DNA de tamanho adequado após análise eletroforética do sistema de reação foi considerada sinal de que a colônia utilizada como DNA molde continha um plasmídeo recombinante. Tais colônias foram então cultivadas em LB para extração plasmidial. Tomou-se o cuidado de incluir sempre controles negativos (água, colônia de *E. coli* sem plasmídeos) e positivos (plasmídeo purificado fechado, plasmídeo contendo um fragmento conhecido) entre as PCRs ao realizar a seleção de clones desta maneira.

Caso necessário, empregou-se o método de seleção de clones através de análise do padrão de restrição por eletroforese. Por este método, colônias de *E. coli* contendo potenciais plasmídeos recombinantes foram cultivadas em meio LB e tiveram seus plasmídeos extraídos conforme previamente descrito. O DNA plasmidial foi então submetido a digestão com enzimas de restrição apropriadas (geralmente duas endonucleases cujos sítios de ligação flanqueassem o sítio de inserção), e os produtos de digestão foram analisados por eletroforese. A presença de bandas de DNA de tamanho esperado foi interpretada como sinal de que o plasmídeo continha o inserto desejado.

Todos os clones cujo inserto derivou de produtos de PCR tiveram seus insertos seqüenciados para confirmar sua identidade e garantir a ausência de mutações indesejadas.

Quando foi possível utilizar a atividade de β -galactosidase das colônias para diferenciar os plasmídeos que continham os insertos desejados (SAMBROOK *et al.*, 1989), as células de *E. coli* transformadas com as ligações alvo foram plaqueadas em meio contendo 40 $\mu\text{g/mL}$ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídio (Xgal – HORWITZ *et al.*, 1964), um composto que é degradado a 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol e galactose pela enzima β -galactosidase. A oxidação/dimerização espontânea de 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol leva à formação de um composto azul (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo). Neste caso, apenas as colônias que apresentaram o fenótipo desejado (colônias brancas, no caso de ligações a pTZ57R) foram submetidas aos processos de seleção por PCR ou por restrição.

4.7.12. Preparo de vetores para reações de ligação

Os vetores foram digeridos com as enzimas de restrição desejadas em sistemas de 25 – 50 μL , e então tratados com 0,2 U de Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) por 1 h 40 min a 37°C. As enzimas foram inativadas mediante incubação a 80°C por 15 min. A concentração e pureza do DNA foram estimadas por espectrofotometria. Quando necessário, os vetores cortados e desfosfatizados foram purificados conforme descrito anteriormente (seção 4.7.2, p. 88).

4.7.13. Preparo de vetor pTZ57R/T para clonagem T/A

O protocolo de preparação de um vetor possuidor de pontas adesivas 3' contendo timidina foi aquele descrito por Marchuk *et al.* (1990), com poucas modificações. Cerca de 100 μg de vetor pTZ57R foram digeridos com 10 unidades de EcoRV em sistema de 50 μL contendo tampão R (Fermentas). Após a 24 h de reação, o sistema foi diluído para volume final de 100 μL , e a esse sistema adicionou-se 1 mM de dTTP e 0,5 μL de Taq DNA polimerase. O sistema foi incubado a 72°C por 4 h. Alíquotas de 10 μL foram congeladas para uso posterior. O vetor assim preparado foi denominado pTZ57R/T. Tipicamente, utilizou-se 0,2 μL deste vetor e 0,5-2 μL do produto de PCR alvo nas reações de ligação (volume final 10 μL).

4.7.14. Quantificação do DNA por espectrofotometria

A concentração do DNA foi estimada pela absorbância da amostra em 260 nm, medida em um aparelho Nanodrop 2000 (Thermo-Fischer Scientific; DESJARDINS e KONKLIN, 2010), supondo $A = 1$ (quando $l = 1 \text{ cm}$) na presença de 50 μg de DNA dupla fita. A presença de proteínas contaminantes foi inferida pela relação absorbância 260nm /

absorbância 280nm, sendo consideradas puras as amostras em que esta relação era próxima de 2 (WILLFINGER *et al.*, 1997).

4.8. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.8.1. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas em solução aquosa foi estimada pelo método de Bradford (1976) adaptado para leitura em leitor de microplaca. A proteína BSA foi utilizada para fazer a curva-padrão de concentração de proteína. A leitura de DO_{600nm} foi feita em placa de 96 poços no equipamento ELX800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek instruments Inc.) ou Promega Glomax Multi Detection System, cada poço contendo 30 μ L de amostra e 170 μ L do reativo de Bradford.

Para a confecção da curva padrão, 0, 3, 5, 10, 15, 20, e 30 μ L de BSA (0,2 mg/mL) foram diluídos em 30, 27, 25, 20, 15, 10, e 0 μ L de água, respectivamente, de modo que os pontos da curva contivessem 0, 0,6, 1, 2, 3, 4, e 6 μ g de proteína por poço. Cada ponto da curva foi feito em triplicata, e o valor da média dos três pontos foi usado para gerar calcular a equação da curva de concentração de proteínas por regressão linear. Curvas com valores de R^2 superiores a 0,98 foram consideradas suficientemente precisas para estimar a concentração de proteínas nas amostras.

4.8.2. SDS-PAGE

A eletroforese desnaturante de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida 12% ou 15% (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). As amostras contendo proteína (tipicamente 10 μ L de amostra) foram diluídas em (geralmente 5 μ L) tampão de amostra desnaturante (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol), e aquecidas a 90°C por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel. As amostras foram submetidas a uma diferença de potencial de 180 V por 50 minutos em tampão de corrida (3 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 0,1% SDS), e coradas com incubação por 1 h em solução corante de azul de Coomassie (50% metanol, 40% água, 10% ácido acético, 0,55 g/L Brilliant Blue R). O excesso de corante foi removido através de fervura dos géis em água ultrapura, seguida de incubação com solução descorante (50% metanol, 40% água, 10% ácido acético). A composição dos géis está descrita abaixo:

TABELA 7 – GÉIS PARA SDS-PAGE

Gel separador			Gel de empilhamento (4%)	
(12%)	(15%)			
H ₂ O	4,35 mL	3,645 mL	H ₂ O	3,162 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,3 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL	SDS 10%	50 µL
Acrilamida:bisacrilamida 29:1, 40%	3 mL	3,75 mL	Acrilamida:bisacrilamida 29:1, 40%	487,5 µL
APS 10%	100 µL	100 µL	APS 10%	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	TEMED	10 µL

4.8.3. Eletroforese não desnaturante de proteínas

A eletroforese não-desnaturante (nativa) de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida 12%, semelhante ao modo descrito por Bonatto *et al.* (2007), mas com algumas simplificações. A composição dos géis pode ser vista abaixo:

TABELA 8 - GEL PARA ELETROFORESE NATIVA

Gel separador (12%)		Gel de empilhamento (4%)	
H ₂ O	6,35 mL	H ₂ O	3,162 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,3 mL
Acrilamida:bisacrilamida 29:1, 40%	1 mL	Acrilamida:bisacrilamida 29:1, 40%	487,5 µL
APS 10%	100 µL	APS 10%	50 µL
TEMED	5 µL	TEMED	10 µL

O tampão de corrida utilizado continha 3 g/L Tris e 14,4 g/L glicina. As corridas foram feitas por 3 horas a 10 mA (cerca de 100 V) a 4°C. O tampão de amostra utilizado continha exclusivamente 25% de glicerol.

4.8.4. Purificação de variantes de NifA

Uma variante de NifA construída neste trabalho (his-hs409-417av[xhoI]) foi selecionada para purificação. Células de *E. coli* JM109(λDE3)pRT22 contendo a variante his-hs409-417av superexpressa a partir do plasmídeo pAAS1637 foram ressuspensas em 10 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glicerol) e rompidas por sonicação em um aparelho Sonicator Ultrasonic Processor XL (Heat Systems), com 15 ciclos de 5 segundos de sonicação e 45 segundos de repouso em gelo para evitar o aquecimento da amostra. O extrato bruto foi submetido a centrifugação a 15000 x g por 30 minutos a 4°C em uma centrífuga Hitachi Himac CR21, usando o rotor nº 46. A fração solúvel foi injetada manualmente em duas colunas Hitrap Heparin 1 mL (GE Healthcare) conectadas *in tandem* (formando uma coluna de 2 mL) pré-equilibradas com tampão A-hep

(50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 10% glicerol). As colunas foram lavadas com 10 mL de tampão A-hep e eluídas com um gradiente em degraus de 5, 10, 20 e 100% de tampão B-hep (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M KCl, 10% glicerol), coletando frações de volumes diferentes. As frações eluídas com 5 a 20% do tampão B, que mostraram-se enriquecidas com his-hs-409-417av[xhol], foram então reunidas e injetadas em uma coluna Hitrap Chelating 1 mL (GE Healthcare) mL carregada com íons Co^{2+} e pré-equilibrada com tampão A-co (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 10% glicerol). A coluna foi lavada com 5 mL de tampão A-co e eluída com um gradiente em degraus de 2 mL de 10, 20, 40 e 100% de tampão B-co (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 10% glicerol, 1 M imidazol), coletando frações de 1 mL. As frações contendo his-hs409-417av[xhol] purificada foram reunidas e utilizadas em ensaios subsequentes.

4.8.5. Purificação de PII

A expressão e purificação de GlnK de *H. seropedicae* seguiram o protocolo descrito por Moure *et al.* (2011), com poucas modificações. As proteínas foram expressas em *E. coli* BL21(λDE3). O pellet de células foi ressuspensionado em 20 mL de tampão A-hep (50 mM HEPES pH 8,0, 100 mM NaCl), lisadas por sonicação, e o extrato bruto foi aquecido a 70°C por 15 minutos. O extrato foi centrifugado a 15000 x *g* por 30 minutos a 4°C em uma centrífuga Hitachi Himac CR21 usando o rotor n° 46. O sobrenadante foi injetado a 1 mL/min em uma coluna Hitrap Heparin 5 mL (GE Healthcare). A coluna foi lavada com 5 volumes de tampão A-hep, e a proteína foi eluída com um gradiente em degraus de 0, 10%, 20%, 50% e 100% de tampão B-hep (50 mM HEPES pH 8,0, 1 M NaCl), coletando frações de 2,5 mL. As frações foram analisadas por SDS-PAGE, e aquelas que continham a proteína GlnK suficientemente pura foram unidas, dialisadas contra tampão de estocagem (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 10% glicerol), concentradas por centrifugação através de filtros Amicon Ultra (Millipore), e mantidas a 4°C até o uso em ensaios subsequentes. No caso da purificação de hsGlnK K58M, uma modificação ao protocolo foi necessária: esta proteína não interage com a resina da coluna de heparina; para purificá-la, utilizou-se uma coluna Hitrap DEAE-Sepharose FF 5 mL (GE Healthcare).

4.8.6. Espectro de dicroísmo circular (CD)

O espectro de absorção de luz circularmente polarizada de variantes de PII de *H. seropedicae* foi determinado em um equipamento Jasco J-1100 operado com o sistema Spectra Manager (Jasco).

4.8.7. Uridililação de variantes de GlnK

A uridililação de proteínas PII foi realizada de acordo com Bonatto *et al.* (2007), com as modificações introduzidas por Oliveira *et al.* (2015), utilizando a proteína his-GlnD de *H. seropedicae* (GlnD contendo uma cauda de histidinas N-terminal) purificada de acordo com Bonatto *et al.* (2007) e cedida pelo Dr. Marco Aurélio Schüller de Oliveira. As reações foram feitas em tampão de uridililação (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 25 mM MgCl₂) e continham 0,2 mM ATP, 5 mM 2OG, 5 mM UTP, 300 µM de GlnK, e 1 µM de GlnD, geralmente para um volume final de 500 µL. As reações foram incubadas por 60 minutos a 30°C para garantir máxima uridililação; posteriormente, a proteína GlnD foi inativada através de incubação do sistema a 70°C por 15 minutos. A uridililação das variantes de GlnK foi verificada pela mobilidade diferencial das proteínas uridililadas em gel de poliacrilamida 10% em um experimento de eletroforese não-desnaturante de proteínas.

4.8.8. Análise de ligação de efetores a PII por calorimetria

Os experimentos de calorimetria foram realizados de acordo com Oliveira e colaboradores (2015). As variantes de GlnK purificadas foram dialisadas contra um tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, e 10 mM MgCl₂; uma amostra do mesmo tampão de diálise foi utilizada como controle negativo nos experimentos de ligação. Os experimentos em si foram feitos com amostras de 200 µL de solução contendo proteínas PII (100 µM, 6 µg/µL) a 20°C no equipamento iTC200 (GE Healthcare). Para cada variante de GlnK, foi realizada a titulação de ATP (injeções progressivas de 5 µmol) e 2OG (injeções progressivas de 5 µmol) separadamente, e a interação entre proteína e ligante foi deduzida pela liberação diferencial de energia térmica em comparação com o calor gerado pela diluição de ATP e 2OG nos experimentos controle. Para a verificação da ligação a 2OG às proteínas, adicionou-se 3 mM ATP à solução de proteína, visto que a presença de ATP é necessária para a ligação de 2OG à proteína GlnK de *H. seropedicae* (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

4.8.9. Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC)

Uma coluna Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare – 17-5173-01) foi equilibrada com tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl) usando o sistema ÄKTA Pure System (GE Healthcare) de cromatografia líquida com monitoramento constante da absorbância a 260 nm na saída da coluna. Quinhentos microlitros de uma amostra de proteína purificada foram injetados a 0,5 mL/min. Frações de 0,5 mL foram coletadas sempre que o aparelho detectou um pico de absorbância a 260 nm, e as frações foram subsequentemente analisadas por SDS-PAGE. O cromatograma gerado para cada corrida foi analisado com o

programa Unicorn 5.1 (GE Healthcare). Para a determinação das massas moleculares das proteínas analisadas, foi feita uma curva de calibração com o kit MWGF200 (Sigma), que contém 5 proteínas com massa molecular conhecida.

4.8.10. Ensaaios de *pull-down*

Os ensaios de *pull-down* foram feitos usando o kit Promega MagneHis (cat. no. V8500). A ligação e a lavagem foram realizadas na presença de tampão A-co (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM KCl, 10% glicerol), com os efetores de PII (2 mM 2OG, 3 mM ATP) adicionados conforme necessário; a eluição foi realizada com tampão B-co (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 10% glicerol, 1 M imidazol). Os ensaios consistiram na incubação de 0,45 µg de hsGlnK ou uma mistura de 0,45 µg de hsGlnK e 0,45 µg de his-hs409-417av[xhoI] com 50 µL de Magnehis ressuspensa em 200 µL de tampão A-co por 5 minutos. As amostras foram então lavadas duas vezes com 100 µL de tampão contendo os mesmos efetores, eluídas com 50 µL de tampão B-co, e analisadas por SDS-PAGE.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PII SOBRE NifA

A proteína NifA de *H. seropedicae* (hsNifA) tem sua atividade de desreprimida pela proteína GlnK (hsGlnK) ou pela proteína GlnB de *H. seropedicae* (hsGlnB), segundo conclui-se dos resultados de diversos estudos anteriores (MONTEIRO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2000; NOINDORF *et al.*, 2006). Para detecção de atividade de hsNifA em *E. coli*, é necessária a coexpressão da proteína ativadora (MONTEIRO *et al.*, 1999; STEFANELLO, 2014).

Anteiramente (STEFANELLO, 2014), observou-se que a maneira mais confiável e reprodutível de se realizar a coexpressão de hsNifA e seus ativadores da família PII requeria clonar os dois genes em um vetor de coexpressão (pETDuet1 – anexo 3). Trabalhos anteriores envolvendo a coexpressão de fragmentos de hsNifA em *E. coli* para medição de atividade (MONTEIRO *et al.*, 1999b) requeriam a introdução de três plasmídeos compatíveis nas células (pRT22 contendo a fusão *nifH::lacZ*, e dois plasmídeos expressando fragmentos de hsNifA / hsNifA e proteínas PII), cada um conferindo resistência a antibióticos distintos; porém, é sabido que a presença de muitos genes de resistência (e o gasto energético de sobreviver à alta concentração de antibióticos), de alto número de cópias dos plasmídeos e a expressão de proteínas heterólogas são prejudiciais ao crescimento de *E. coli* (BENTLEY *et al.*, 1990; BIRNBAUM e BAILEY, 1991; DIAZ e HERNANDEZ, 2000) a ponto de inviabilizar o cultivo celular em certas condições. Em nosso laboratório, a presença de três plasmídeos diferentes, dois dos quais expressando variantes de hsNifA e PII, levou a um crescimento lento de *E. coli* em placas de LA e ausência de crescimento em meio líquido. Em vista disto, preferiu-se adotar o sistema de expressão dual mencionado no início do parágrafo.

Os testes realizados à época demonstraram que proteínas PII de diferentes organismos, bem como alguns mutantes de hsGlnK contendo substituições (V52S, D54S, Q94L, G108N, D110A), são capazes de ativar hsNifA; dois mutantes de hsGlnK, Y51F e G89A (incapazes de sofrer uridililação e de ligar-se a ATP, ADP, e 2OG, respectivamente) também foram estudados no mesmo trabalho, e os resultados sugeriram que a interação de PII com seus efetores (ATP, ADP e 2OG) é essencial para a ativação de hsNifA, ao passo que a uridililação é importante para máxima atividade porém não é absolutamente requerida (STEFANELLO, 2014). A deleção do T-loop de hsGlnK ($\Delta 45-54$) também impediu a ativação de hsNifA, sugerindo que esta região seria importante para a regulação de hsNifA por PII.

Visando entender melhor o papel da interação de hsGlnK com seus efetores sobre a regulação de hsNifA, o presente trabalho relata a construção de um gene para expressão de hsGlnK contendo a substituição K58M, que impede a interação com 2OG. O resíduo K58

foi caracterizado como sendo essencial para a interação entre GlnZ e 2OG (TRUAN *et al.*, 2010), e um mutante K58A em GlnJ de *R. rubrum* é insensível a 2OG (TEIXEIRA *et al.*, 2008). A capacidade deste mutante de ativar a transcrição da proteína hsNifA foi então avaliada em *E. coli*. As variantes de hsGlnK contendo Y51F, K58M, G89A, e a deleção do T-loop foram também superexpressas, purificadas e caracterizadas *in vitro* em busca de explicações para os fenótipos observados.

Durante a purificação de hsGlnK Y51F, constatou-se que os plasmídeos utilizados para sua expressão possuem, sem exceção, uma deleção integral do códon de parada, que leva à expressão de uma proteína de fusão entre hsGlnKY51F e a sequência GSEFELRRQACGRTRAPPPPLRSGC* (em pET29a) ou GSEFELGAPAGRQACGRIMLKSNRK* (em pETDuet1). A descoberta deste problema colocou em dúvida todos os resultados obtidos anteriormente com esta construção, e trouxe a necessidade de reconstruir o plasmídeo em questão.

Além disso, duas novas variantes de PII (GlnK de *A. vinelandii* e hsGlnK H42Q) foram avaliadas quanto a sua capacidade de ativar hsNifA em *E. coli*, e os resultados obtidos foram somados aos que já se possuía a respeito de GlnB de *H. seropedicae*, *A. brasilense* e *E. coli*, GlnK de *H. seropedicae* e GlnZ de *A. brasilense* para tentar localizar a superfície de interação entre PII e hsNifA.

5.1.1. Construção de plasmídeos para coexpressão de NifA e variantes de PII

5.1.1.1. Construção de um plasmídeo para a coexpressão de hsNifA e avGlnK

O plasmídeo pYZ1 (LITTLE *et al.*, 2000), que contém o gene *glnK* de *A. vinelandii* (*av glnK*) inserido entre os sítios *NdeI* e *BamHI* de pT7-7, foi digerido com estas mesmas enzimas para liberação do inserto; o gene *av glnK* obtido foi clonado em pET29a, também digerido com *NdeI/BamHI*, gerando o plasmídeo pAAS1509. pAAS1509 foi então digerido com as enzimas *XbaI/BamHI*, e o fragmento contendo o gene *av glnK* e a região promotora de pET29a foi ligado ao plasmídeo DNifA digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo pAAS1532. pAAS1532 pode ser usado para expressão avGlnK e hsNifA em *E. coli*, cada qual a partir de seu próprio promotor *T7/lacO*.

5.1.1.2. Construção dos plasmídeos para coexpressão de NifA e mutantes pontuais de hsGlnK

Variantes do gene *glnK* de *H. seropedicae* (*hs glnK*) contendo as substituições K58M e Y51F foram obtidas por PCR com oligonucleotídeos mutagênicos.

Para a construção de plasmídeos para a expressão de hsGlnK K58M, o plasmídeo pEMB200 (BONATTO *et al.*, 2000) foi usado como DNA molde para dois sistemas de PCR:

um contendo os *primers* T7F grd e hsGlnK K58M r, e o outro contendo os *primers* hsGlnK K58M f e T7term grd. O sucesso da amplificação foi confirmado por eletroforese de DNA. Meio microlitro de cada uma das reações supracitadas foi usado como DNA molde para uma nova reação de PCR contendo os *primers* T7F grd e T7trem grd, em um volume final de 25 µL. O produto desta reação foi ligado diretamente a pTZ57R/T e transformado em *E. coli* TOP10. Colônias que apresentaram cor branca quando cultivadas em LA + Ap na presença de Xgal tiveram seus plasmídeos extraídos e avaliados por restrição com *Xba*I/*Bam*HI; um plasmídeo contendo um fragmento de tamanho correto foi selecionado e seqüenciado para confirmar a presença do inserto correto com somente a mutação causadora de K58M em hsGlnK. Este plasmídeo foi denominado pAASHsglnKK58MTZ. pAASHsglnKK58MTZ foi digerido com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI, e o inserto contendo o gene *hs glnK* K58M foi transferido para pET29a digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo pAASHsglnKK58M29. pAASHsglnKK58M29 foi então digerido com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI, e o inserto contendo o gene *hs glnK* K58M foi transferido para DNifA cortado com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo HsglnKK58MDNifA. HsglnKK58MDNifA expressa hsGlnK K58M e hsNifA em *E. coli*, cada qual a partir de seu próprio promotor *T7/lacO*.

Para a construção *de novo* de plasmídeos para a expressão de hsGlnK Y51F, o plasmídeo pEMB200 foi DNA molde para dois sistemas de PCR: um contendo os *primers* T7F grd e GlnKY51R, e o outro contendo os *primers* GlnKY51F e T7term grd. O sucesso da amplificação foi confirmado por eletroforese de DNA. Meio microlitro de cada uma das reações supracitadas foi usado como DNA molde para uma nova reação de PCR contendo os *primers* T7F grd e T7trem grd, em um volume final de 25 µL. O produto desta reação foi ligado diretamente a pTZ57R/T e transformado em *E. coli* TOP10. Colônias que apresentando cor branca quando cultivadas em LA + Ap na presença de Xgal tiveram seus plasmídeos extraídos e avaliados por restrição com *Xba*I/*Bam*HI; um plasmídeo contendo um fragmento de tamanho correto foi selecionado e seqüenciado para confirmar a presença do inserto correto com somente a mutação causadora de Y51F em hsGlnK (especial atenção foi dada à presença do códon de parada desta vez). Este plasmídeo foi denominado pAASHsglnKY51FTZend. pAASHsglnKY51FTZend foi digerido com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI, e o inserto contendo o gene *hs glnK* Y51F foi transferido para pET29a digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo pAASHsglnKY51F29end. pAASHsglnKY51F29end foi então digerido com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI, e o inserto contendo o gene *hs glnK* Y51F foi transferido para DNifA cortado com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo HsglnKY51FendDNifA. HsglnKY51FendDNifA expressa hsGlnK Y51F e hsNifA em *E. coli*, cada qual a partir de seu próprio promotor *T7/lacO*.

Para a construção de plasmídeos para a expressão de hsGlnK H42Q, o plasmídeo pEMB200 (BONATTO *et al.*, 2000) foi amplificado em dois sistemas de PCR: um contendo

os *primers* T7F grd e hsglnK H42Q rev, e o outro contendo os *primers* hsglnK H42Q fwd e T7term grd. Meio microlitro de cada uma das reações foi usado como DNA molde para uma nova reação de PCR contendo os *primers* T7F grd e T7term grd, em um volume final de 25 µL. O produto desta reação foi purificado, digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, e ligado a pET29a cortado com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada em *E. coli* TOP10. Colônias que apresentaram cor branca quando cultivadas em LA + Ap na presença de Xgal tiveram seus plasmídeos extraídos e avaliados por restrição com *XbaI/BamHI*, e um plasmídeo contendo um fragmento de tamanho correto foi seqüenciado para confirmar a presença do inserto correto e a presença de somente a mutação desejada. Este plasmídeo foi denominado pAAS1508. pAAS1508 foi digerido com as enzimas *XbaI* e *BamHI*, e o inserto contendo o gene *av glnK* foi transferido para DNifA digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo pAAS1532. pAAS1532 expressa avGlnK e hsNifA em *E. coli*, cada qual a partir de seu próprio promotor *T7/lacO*.

5.1.2. Avaliação da ativação de hsNifA por variantes de hsGlnK em *E. coli*

A atividade da proteína hsNifA quando coexpressa com as novas variantes de hsGlnK foi estimada por meio de ensaios de atividade de β-galactosidase. Células de *E. coli* JM109(λDE3) contendo o plasmídeo-repórter pRT22 (*nifH::lacZ*) foram transformadas com os plasmídeos DN185, DNifA, HsglnKDNifA, HsglnKY51FendDNifA, HsglnKK58MDNifA, HsglnKG89ADNifA, HsdeltaTglnKDNifA. Os transformantes foram cultivados na ausência ou presença de 20 mM NH₄Cl conforme descrito na seção 4.5.4 (p. 82), para a realização dos ensaios de atividade enzimática. Os resultados são mostrados na figura 12:

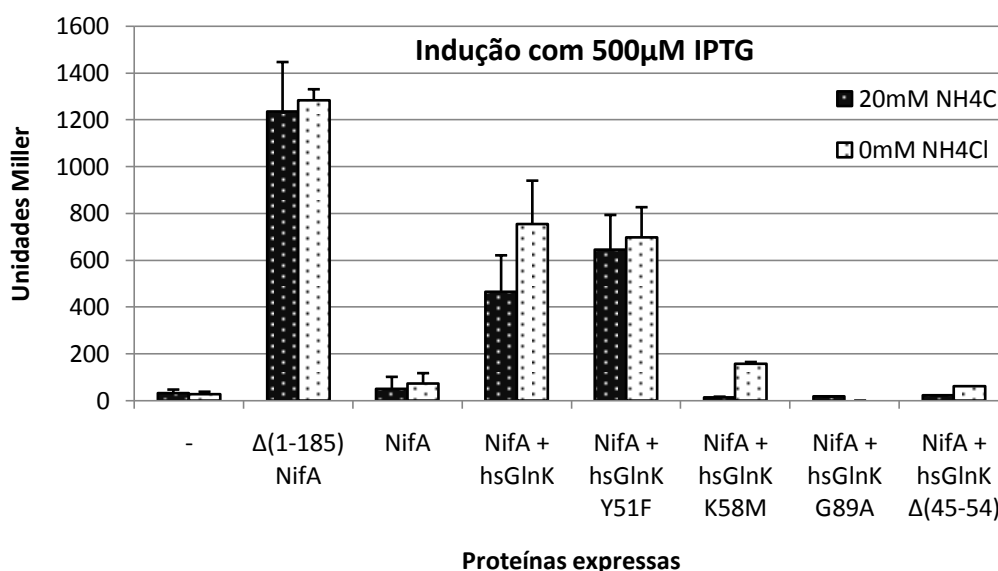


Figura 12 - Atividade de β -galactosidase detectada em culturas expressando hsNifA e variantes de hsGlnK sob alta indução.

As células foram cultivadas sob uma atmosfera anóxica por 6 h a 30°C em meio NFDM suplementado com 0,02% casaminoácidos e 500 μ M de IPTG (para induzir fortemente a expressão das proteínas). $\Delta(1-185)$ NifA é uma variante de NifA que não possui os primeiros 185 resíduos de aminoácidos que constituem o domínio GAF, e sua atividade não é inibida por íons amônio (STEFANELLO, 2011). Os resultados constituem a média de ao menos três experimentos. O controle negativo (-) corresponde a *E. coli* JM109(λ DE3)pRT22 sem outros plasmídeos. As demais células continham os plasmídeos DN185, DNifA, HsglnKDNifA, HsglnKY51FendDNifA, HsglnKK58MDNifA, HsglnKG89ADNifA, e HsdeltaTglnKDNifA, respectivamente.

Como já observado anteriormente (STEFANELLO, 2014), a ativação de hsNifA por hsGlnK em *E. coli* é detectada tanto na presença como na ausência de amônio, diferente do que se observa *H. seropedicae* com o emprego do mesmo gene repórter (STEFANELLO, 2011), e diferente do que é esperado para que este sistema de regulação funcione no organismo original. Esta alta atividade na presença de amônio provavelmente ocorre devido ao alto nível de expressão de PII e hsNifA neste sistema reconstruído *E. coli*. Na presença de 500 μ M de IPTG, os promotores *T7/lacO* de pETDuet1 promovem níveis de expressão presumivelmente muito mais altos do que os obtidos pelos promotores nativos de *nifA* e *glnK*. Esta alta expressão, que leva à acumulação de hsNifA e hsGlnK no citoplasma de *E. coli*, pode ser responsável por levar formas menos ativadoras de GlnK a ativarem uma quantidade detectável de hsNifA mesmo na presença de amônio. A alta expressão a partir de *T7/lacO* é também independente de amônio, o que por si só introduz uma diferença no sistema existente em *H. seropedicae*: neste organismo, a transcrição *glnK* é reprimida na presença de amônio (NOINDORF *et al.*, 2005), de modo que há menos proteína PII total disponível no citoplasma de *H. seropedicae* cultivado a 20 mM de amônio do que em ausência de amônio. Além disso, na presença de amônio, acredita-se que maioria das proteínas PII esteja complexada com AmtB, tornando-se indisponível para interação com

NifA (HUERGO *et al.*, 2010); nada disso ocorre no sistema reconstruído em *E. coli*, no qual não há controle transcricional mediado por amônio dos níveis hsGlnK. Apesar do comportamento diferente do observado em *H. seropedicae*, nosso modelo de atividade de *E. coli* diferencia de forma confiável NifA ativa e inativa, e evidencia com clareza as diferenças de fenótipo entre os mutantes de hsGlnK.

A hipótese de que a ativação de hsNifA na presença de amônio seria fruto do alto nível de expressão é reforçada pela observação de que esta ativação é reduzida na ausência do indutor IPTG (STEFANELLO, 2014), ao passo que a ativação na ausência de amônio mantém-se mais elevada; a figura 13 mostra um experimento semelhante ao descrito na figura 12, diferindo apenas na ausência do indutor IPTG:

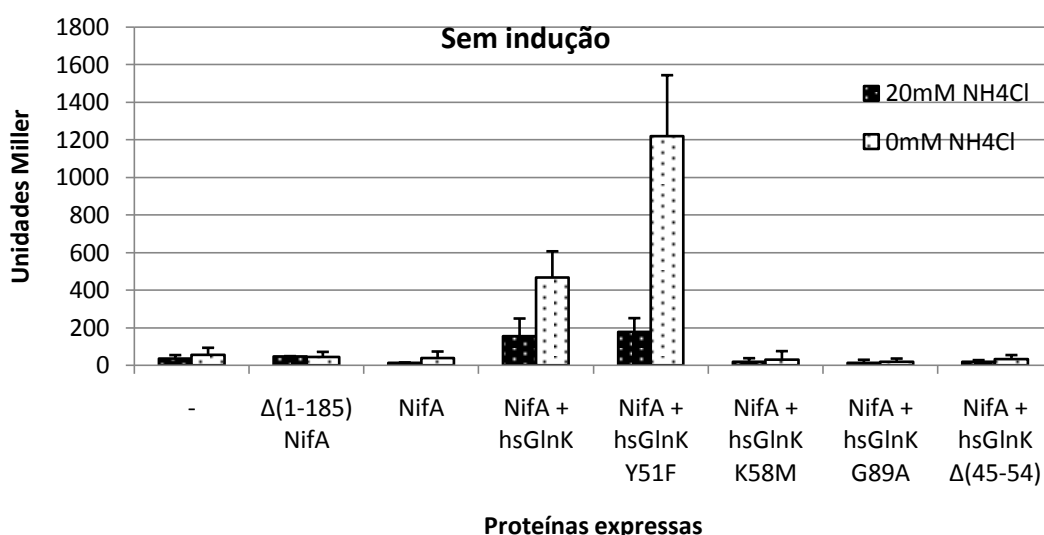


Figura 13 - Atividade de β -galactosidase detectada em culturas expressando hsNifA e variantes de hsGlnK sob ausência de indução.

As células foram cultivadas sob uma atmosfera anóxica por 6 h a 30°C em meio NFDMD suplementado com 0,02% casaminoácidos, sem adição de IPTG. $\Delta(1-185)$ NifA, a variante de NifA que não possui os primeiros 185 resíduos de aminoácidos que constituem o domínio GAF, é muito pouco ativa na ausência de indução. Os resultados constituem a média de ao menos três experimentos. O controle negativo (-) corresponde a *E. coli* JM109(λ DE3)pRT22 sem outros plasmídeos. As demais células continham os plasmídeos DN185, DNifA, HsglnKDNifA, HsglnKY51FendDNifA, HsglnKK58MDNifA, e HsglnKG89ADNifA, respectivamente.

Os dois experimentos realizados conduzem às seguintes observações:

1. Como previamente relatado, a proteína hsNifA expressa isoladamente em *E. coli* não é capaz de ativar a transcrição de *nifH::lacZ*, embora a proteína GlnB de *E. coli* seja capaz de ativar NifA (STEFANELLO, 2014; ver também seção 5.1.7). É provável que a concentração mínima de PII para induzir a ativação de hsNifA seja maior do que a concentração total de PII livre no citoplasma de *E. coli*.

2. A proteína $\Delta(1-185)$ NifA apresenta alta atividade quando superexpressa, e nenhuma na ausência de indução; esta proteína é bastante ativa quando superexpressa, mas possivelmente não é muito estável em *E. coli*.
3. Como também previamente reportado, hsGlnK G89A e $\Delta(45-54)$ hsGlnK são incapazes de ativar NifA em quaisquer das condições testadas, mesmo quando superexpressas. É provável que a incapacidade de ligação a ATP, ADP e 2OG seja responsável pelo fenótipo da primeira, ao passo que se supõe que a perda de resíduos do T-loop na segunda cause dificuldades na interação com hsNifA.
4. hsglnK K58M possui uma capacidade residual de ativar hsNifA quando superexpressa em baixa concentração de amônio, mas somente nesta condição; no geral, é bem clara a drástica redução de sua eficiência em ativar hsNifA, indicando que a de PII interação com 2OG é de grande importância para a transmissão do sinal ativador.
5. A nova construção de hsGlnK Y51F, por fim, possui essencialmente a mesma capacidade de ativação de hsNifA que hsGlnK selvagem – sugerindo que, diferente do que ocorre em outros organismos próximos de *H. seropedicae* (ARAÚJO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2001), a uridililação de hsGlnK não tem efeito direto sobre a regulação de hsNifA por PII.

Considerando os pontos levantados, os resultados dos experimentos em *E. coli* sugerem um modelo de regulação em que a interação de hsGlnK com ATP/ADP é essencial, e a interação com 2OG é o evento principal a dirigir a ativação de hsNifA; isto porque a proteína hsGlnK G89A, incapaz de ligar-se a ATP ou 2OG, revelou-se incapaz de ativar NifA em quaisquer condições testadas, indicando que a interação com os efetores é absolutamente essencial para sua função. A grande limitação da capacidade de hsGlnK K58M em ativar hsNifA sugere que a interação com 2OG é principal responsável por alterar a conformação de hsGlnK de sua forma não-ativadora para ativadora. O papel dominante de 2OG na ativação de NifA é confirmado pelo fenótipo de hsGlnK Y51F, a variante de hsGlnK incapaz de sofrer uridililação. Em contraste com a impossibilidade de ligação a 2OG, a impossibilidade de uridililação de hsGlnK parece não ter efeitos negativos diretos sobre a ativação de hsNifA.

5.1.3. Purificação de variantes de GlnK de *H. seropedicae*

A fim de confirmar os fenótipos esperados para as mutações K58M, G89A, e $\Delta(45-54)$ de hsGlnK, procedeu-se com a purificação destas proteínas para caracterização de algumas de suas propriedades *in vitro*.

Os plasmídeos pETHsglnB, pEMB200, pAASHsglnKK58M29, pAASHsglnKG89A29, e pAASHdeltaTglnK29 (codificando para hsGlnB, hsGlnK, hsGlnK K58M, hsGlnK G89A, e

hsGlnK $\Delta(45-54)$, respectivamente) foram transformados em *E. coli* BL21(λ DE3). A expressão das proteínas foi realizada conforme descrito na seção 4.5.5 (p. 83). A purificação foi realizada conforme descrito em 4.8.5 (p. 97). O grau de pureza das proteínas após os procedimentos de purificação foi estimado visualmente após análise por SDS-PAGE, e considerado satisfatório (figura 14). A concentração das proteínas após os procedimentos de purificação e concentração manteve-se em torno de 10 mg/mL.

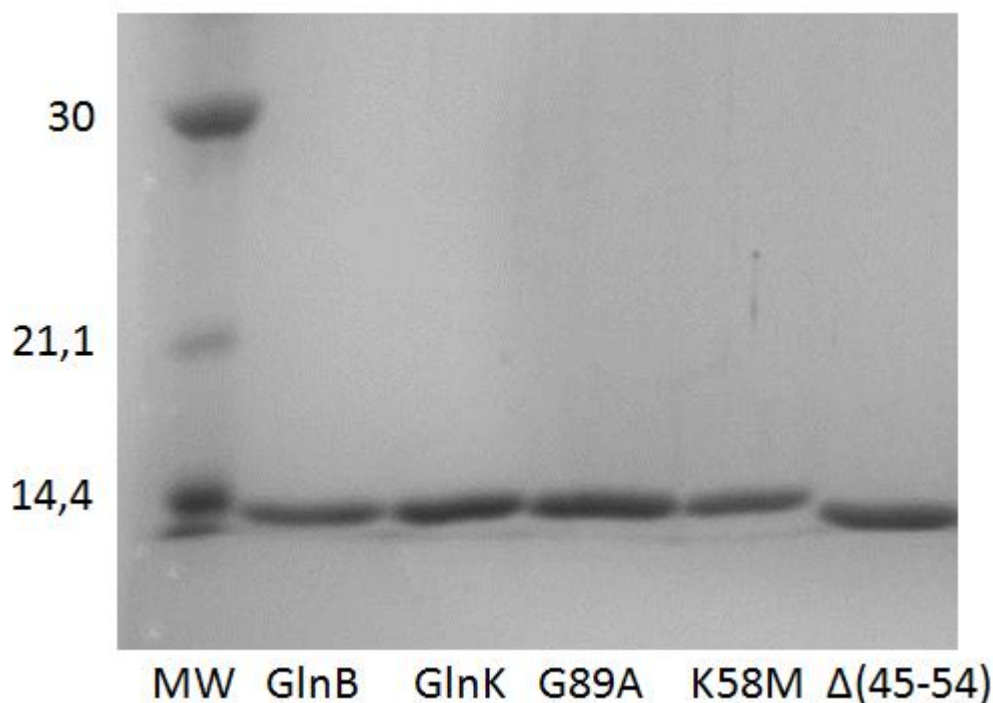


Figura 14 - Purificação de hsGlnB, hsGlnK, hsGlnK K58M, hsGlnK G89A, e hsGlnK $\Delta(45-54)$.

Meio microlitro de cada proteína purificada foi analisado por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese ocorreu por 1 hora a 180V. MW, marcador de massa molecular de proteínas (LMW, GE Healthcare cat. no. 17044601). Todas as proteínas apresentam o peso molecular esperado (abaixo de 14 kDa), e o tamanho menor de $\Delta(45-54)$ hsGlnK pode ser facilmente percebido. Os valores à esquerda representam a massa das bandas do marcador de massa molecular em kiloDaltons.

5.1.4. Dicroísmo circular de variantes de PII

Inicialmente, as proteínas purificadas foram analisadas quanto a seu espectro de absorção de ondas eletromagnéticas circularmente polarizadas entre 190 e 300nm. Os diferentes motivos da estrutura secundária de proteínas (α -hélice, folha- β , e regiões de baixa estruturação) possuem padrões característicos de absorção nessa faixa, e o espectro de absorção de uma determinada proteína é, a grosso modo, o somatório da absorção de suas regiões de estrutura secundária (GREENFIELD, 2006). Embora seja difícil fazer qualquer inferência a partir de um espectro isolado, experimentos de dicroísmo circular são úteis para comparar proteínas que se acredita serem estruturalmente semelhantes; caso diferenças pequenas na sequência de aminoácidos levem a grandes alterações na estrutura

secundária, é possível detectar diferenças no padrão de absorção dos diferentes comprimentos de onda.

Para avaliar se as mutações introduzidas em hsGlnK geraram modificações significativas na estruturação da proteína (o que poderia explicar a dificuldade das proteínas contendo K58M e G89A em ativar NifA), as proteínas purificadas foram dialisadas contra um mesmo tampão de análise (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM NaCl) e analisadas quanto a seu padrão de absorção em um equipamento Jasco J-1100, operado com o sistema Spectra Manager. Uma sobreposição das curvas de absorção pode ser vista na figura 15:

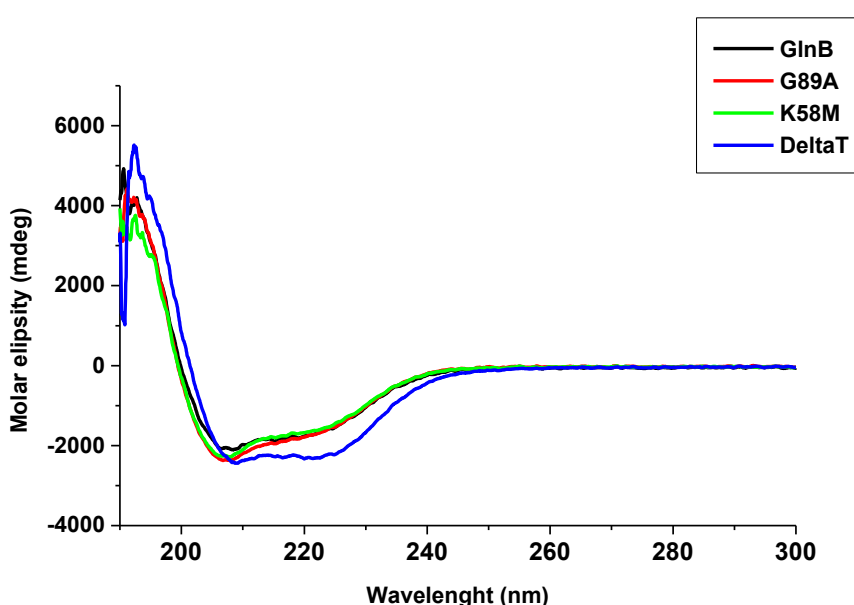


Figura 15 – Espectro de dicroísmo circular de hsGlnB, hsGlnK K58M, hsGlnK G89A, e hsGlnK $\Delta(45-54)$ entre 190 e 300nm.

Observa-se que as curvas de dicroísmo circular de hsGlnB, hsGlnK K58M, e hsGlnK G89A são praticamente coincidentes, indicando que as substituições K58M e G89A em hsGlnK não levaram geraram mudanças estruturais significativas – o que sugere que seu fracasso em ativar hsNifA não resulta de alterações na estrutura da proteína, reforçando a hipótese de que a incapacidade de ligação a efetores seria a explicação para o fenótipo observado nos experimentos em *E. coli*. A variante de hsGlnK $\Delta(45-54)$, por sua vez, apresentou um espectro diferente das demais proteínas, o que é consistente com a extensa modificação causada pela remoção dos 10 resíduos que constituem a região pouco estruturada do T-loop.

5.1.5. Uridililação de mutantes pontuais de GlnK

As variantes de hsGlnK contendo as substituições K58M e G89A foram avaliadas quanto a suas respectivas capacidades de sofrerem uridililação catalisada pela proteína GlnD. Trabalhos realizados com proteínas PII de *H. seropedicae* determinaram que a presença de ATP e 2OG é condição necessária para a ocorrência de uridililação *in vitro* (BONATTO *et al.*, 2007); uma vez que GlnD de *E. coli* (e, presume-se, GlnD de *H. seropedicae*) não é capaz de ligar-se a 2OG ou ATP (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998), concluiu-se que a presença dessas duas moléculas no sítio de ligação de PII é necessária para que PII atinja a conformação correta para receber o grupo uridilil de GlnD. Um modelo de regulação semelhante foi proposto para a uridililação de PII em *H. seropedicae*, embora com caracterização menos extensiva (BONATTO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Embora os experimentos de ativação de transcrição em *E. coli* sugiram que a uridililação de hsGlnK não tem efeito direto sobre a ativação de hsNifA por hsGlnK, decidiu-se caracterizar este aspecto das variantes K58M e G89A. O ensaio de uridililação total foi realizado conforme descrito na seção 4.8.7 (p. 98). Uma amostra de cada sistema de reação (para hsGlnK, hsGlnK K58M, hsGlnK G89A) foi aplicada em um gel de poliácridamida não desnaturante e submetido a eletroforese a 60 V por 3 horas a 4°C para permitir a separação das bandas de PII em diferentes estados de uridililação. Proteínas PII uridililadas migram mais rapidamente que proteínas PII não-uridililadas, e a resolução do gel permite distinguir quatro bandas correspondentes aos diferentes estados de uridililação possíveis do trímero de PII (PII-UMP₀, PII-UMP₁, PII-UMP₂, e PII-UMP₃ – ATKINSON *et al.*, 1994). Os resultados são mostrados na figura 16.

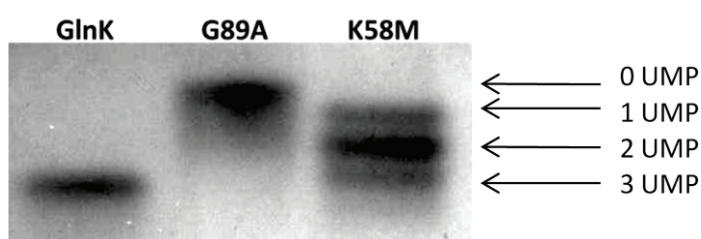


Figura 16 - Avaliação do estado de uridililação de variantes de hsGlnK após o experimento de uridililação.

Variantes de hsGlnK foram purificadas (ver seção 4.8.5, p. 97) e uridililadas (seção 4.8.7, p. 98) conforme descrito. Cerca de 50 µg de cada proteína foram analisadas por eletroforese em gel não desnaturante, que permite distinguir bandas correspondentes aos quatro estados de uridililação possíveis do trímero de PII. Os números 0, 1, 2, e 3 à direita da foto indicam a presença de zero, um, dois, ou três monômeros uridililados na preparação.

A proteína hsGlnK sofre uridililação total (todos os trímeros contêm três monômeros uridililados) após incubação prolongada com GlnD, UTP, ATP, e 2OG. Conforme esperado, a variante hsGlnK G89A sofre pouca uridililação (>90% não uridililada, de acordo com uma

estimativa da densidade das bandas), conforme já observado em GlnB de *E. coli* contendo esta mesma mutação (JIANG, ZUCKER, e NINFA, 1997); a incapacidade de interagir com ATP e 2OG possivelmente impede-a de atingir a conformação mais favorável para tornar-se substrato de GlnD. Note-se, porém que a incapacidade de ligar-se aos efetores não impede a proteína de formar a estrutura trimérica característica das proteínas PII, como evidenciado pela formação de uma banda específica com o padrão de migração esperado para PII-UMP₀.

A variante de hsGlnK K58M mostrou-se capaz de sofrer uridililação parcial por GlnD (analisando-se o padrão de migração, a maioria das unidades adquiriu aparenta ter adquirido duas unidades de UMP); uma análise densitométrica das bandas permitiu estimar que 20% dos trímeros continham um monômero uridililado, 50% continham dois, e 30% continham três. Mesmo uma incubação prolongada não conduziu à uridililação total de todos os monômeros de hsGlnK K58M, diferentemente do que se vê com hsGlnK, mas semelhante ao que se observa em outras variantes de GlnB em *E. coli* (JIANG, PELISKA e NINFA, 1998); porém, sua incapacidade de interação com 2OG não impediu a uridililação na mesma extensão em que a substituição G89A o fez. As razões para este fenótipo possivelmente envolvem uma interação não caracterizada entre 2OG e a proteína GlnD de *H. seropedicae*, e estão em estudo em outro trabalho (Marco Aurélio Schuler de Oliveira, comunicação pessoal).

5.1.6. Capacidade de ligação a efetores de variantes de PII

Para confirmar os fenótipos esperados para hsGlnK K58M (incapacidade de interação com 2OG) e hsGlnK G89A (incapacidade de interação com ATP e 2OG), ambas as proteínas foram submetidas a experimentos de detecção de ligação a efetores por calorimetria. A adição de quantidades conhecidas de um ligante a uma solução de proteína gera alteração na energia térmica do sistema, que pode ser detectada como pequenas variações na temperatura da solução através de um equipamento suficientemente sensível. A adição de quantidades conhecidas de ligante permite a construção de uma curva de afinidade e estimativa da constante de dissociação de uma determinada proteína pelo ligante avaliado. A afinidade das proteínas PII de *H. seropedicae* por ATP, ADP e 2OG já foi extensamente caracterizada (OLIVEIRA *et al.*, 2015), facilitando a comparação das curvas obtidas com os experimentos envolvendo as variantes de hsGlnK.

Os experimentos foram realizados em um aparelho iTC200 (GE Healthcare) conforme descrito na seção 4.8.8 (p. 98). Conforme esperado, hsGlnK K58M foi incapaz de ligar 2OG (figura 17A) e hsGlnK G89A foi incapaz de ligar ATP (figura 17B).

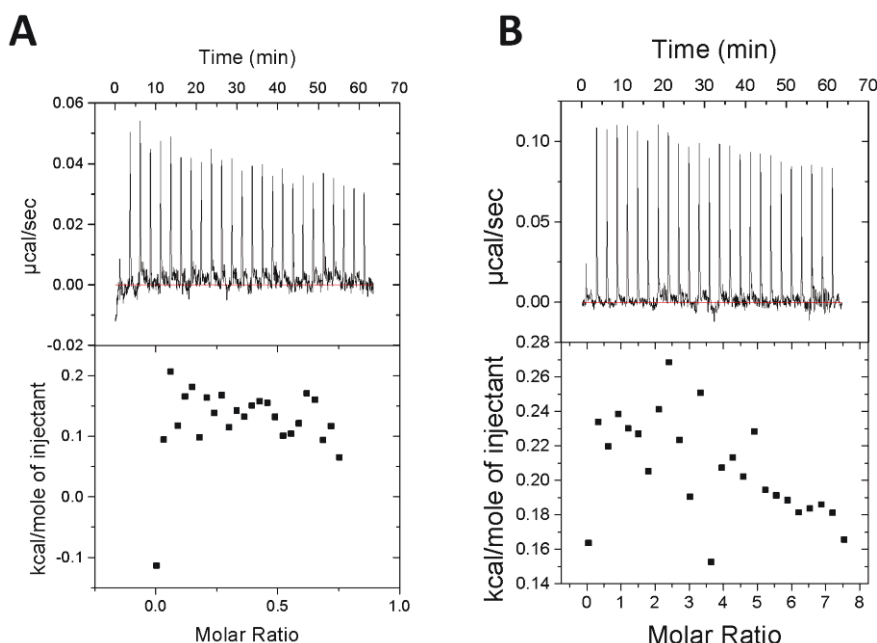


Figura 17 - Gráficos obtidos dos experimentos de ligação de (A) 2OG a hsGlnK K58M na presença de 3 mM ATP e (B) de ATP a hsGlnK G89A na ausência de outros efetores.

A pouca alteração de temperatura e a ausência de um padrão de aumento progressivo dos níveis de liberação/absorção de energia térmica (comparar com a figura 18) indicam que não houve interação entre as proteínas e os ligantes testados.

Experimentos de afinidade por ATP também foram realizados com a proteína hsGlnK K58M (para descartar a possibilidade de sua falta de interação com 2OG ser devida a algum impedimento para ligar ATP) e com a proteína hsGlnK $\Delta(45-54)$. Esta última proteína é totalmente incapaz de ativar hsNifA, presumivelmente devido a não possuir o T-loop, uma região importante para a maioria das interações entre proteínas PII e seus alvos regulatórios já caracterizados (HUERGO, CHANDRA, e MERRICK, 2013). No entanto, a pouca importância da uridililação de hsGlnK para a ativação de hsNifA levanta a possibilidade de que o T-loop não esteja diretamente envolvido na interação; neste caso, a falta de ativação de hsNifA por hsGlnK $\Delta(45-54)$ poderia ser devida a um efeito secundário da remoção do T-loop sobre a proteína – possivelmente, sobre sua habilidade de interação com efetores. Uma comparação das curvas de titulação de ATP de hsGlnK, hsGlnK K58M, e hsGlnK $\Delta(45-54)$, obtidas com as três proteínas na mesma concentração, é mostrada na figura 18:

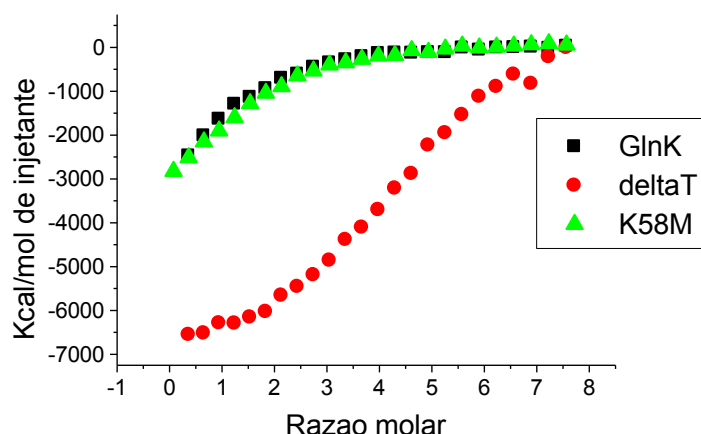


Figura 18 - Gráficos obtidos dos experimentos de ligação de ATP a hsGlnK, hsGlnK K58M, e hsGlnK $\Delta(45-54)$, na ausência de outros efetores.

A rápida saturação da curva variação de energia térmica nos experimentos com hsGlnK e hsGlnK K58M indica sua alta afinidade por ATP (calculada para os três sítios como $K_{d1} = 3,4 \mu\text{M}$, $K_{d2} = 50,5 \mu\text{M}$, e $K_{d3} = 166,7 \mu\text{M}$ por OLIVEIRA *et al.*, 2015); a lenta saturação da curva de $\Delta(45-54)$ hsGlnK indica sua afinidade mais baixa por ATP.

Observa-se que a proteína hsGlnK K58M possui essencialmente a mesma afinidade por ATP que a proteína hsGlnK selvagem, conforme se esperava – indicando que o fenótipo observado para esta proteína não decorre de dificuldades na interação com ATP, mas sim de deficiências na ligação de 2OG. A proteína hsGlnK $\Delta(45-54)$, por outro lado, apresenta uma clara deficiência na interação com ATP. Embora não seja completamente incapaz de ligar-se a este efector (como hsGlnK G89A), a baixa afinidade desta proteína por ATP é evidente, e é uma possível explicação para a completa perda da capacidade de ativar hsNifA mesmo se o T-loop não estiver envolvido na interação proteína-proteína.

5.1.7. Avaliação da ativação de NifA por diversas proteínas PII em *E. coli*

Previamente (STEFANELLO, 2014), o sistema de coexpressão de NifA e PII em *E. coli* havia sido utilizado para avaliar a capacidade de ativar hsNifA de proteínas PII de diferentes organismos. Constatou-se que hsNifA não exige uma única proteína PII específica, podendo ser ativada por GlnB e GlnK de *H. seropedicae*, GlnB de *A. brasilense* (abGlnB), GlnB de *E. coli* (ecGlnB), e uma quimera de GlnB e GlnZ de *A. brasilense* contendo os resíduos 1-91 de abGlnB e 92-112 de abGlnZ (abGlnBZ1). A ativação de hsNifA por hsGlnB não ocorre em condições fisiológicas em *H. seropedicae*, mas pode ocorrer com a expressão heteróloga de hsGlnB a partir do promotor de *glnK* em um mutante *glnK*- (NOINDORF *et al.*, 2011), indicando que, em termos de ativação de hsNifA, a diferença entre hsGlnB e hsGlnK é simplesmente a diferença entre alta e baixa concentração de PII no citoplasma. Esta hipótese é corroborada pela inatividade de hsNifA em *E. coli*, embora ecGlnB seja perfeitamente capaz de ativar hsNifA (STEFANELO, 2014);

os níveis intracelulares de ecGlnB, presumivelmente, não são elevados o suficiente para permitir a ativação de hsNifA na ausência de expressão heteróloga. É possível que hsNifA possua baixa afinidade por seu ativador (PII), requerendo expressão vigorosa para que se observe ativação transcricional.

A ativação de NifA por PII somente não foi observada durante a coexpressão com GlnZ de *A. brasilense* (abGlnZ), com uma quimera contendo os resíduos 1-48 de abGlnZ e 49-112 de abGlnB (abGlnZB1), e com variantes de PII com deleções do T-loop (Δ 45-54). A estes dados, adiciona-se aqui os resultados obtidos com a coexpressão de avGlnK e de hsGlnK H42Q com hsNifA.

Células de *E. coli* JM109(λ DE3) contendo o plasmídeo-repórter pRT22 (*nifH::lacZ*) foram transformadas com os plasmídeos DN185, DNifA, HsglnBDNifA, HsglnKDNifA, EcglnBDNifA, AbGlnBDNifA, AbdeltaTGlnBDNifA, AbGlnZDNifA, AbB91ZDNifA, AbZ48BDNifA, pAAS1532, e pAAS1516. Os transformantes foram cultivados em condição de baixo (0 mM NH_4Cl) ou alto (20 mM NH_4Cl) amônio conforme descrito na seção 4.5.4 (p. 82) para a realização dos ensaios de atividade enzimática. Os resultados são mostrados na figura abaixo:

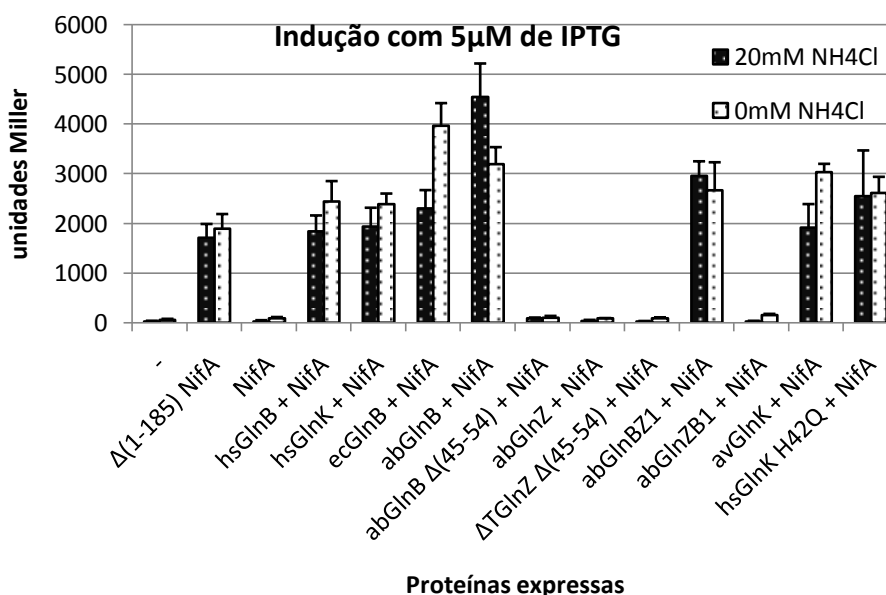


Figura 19 - Atividade de β -galactosidase detectada em culturas de *E. coli* JM109(λ DE3)pRT22 expressando hsNifA e variantes de hsGlnK em baixa indução.

As células foram cultivadas sob uma atmosfera anóxica por 6 h a 30°C em meio NFDM suplementado com 0,02% casaminoácidos e 5 μ M de IPTG (para induzir moderadamente a expressão das proteínas). Δ (1-185)NifA é uma variante de NifA que não possui os primeiros 185 resíduos de aminoácidos que constituem o domínio GAF, e sua atividade não é inibida por íons amônio. Os resultados constituem a média de ao menos três experimentos. O controle negativo (-) corresponde a *E. coli* JM109(λ DE3)pRT22 sem outros plasmídeos. As demais células continham os plasmídeos DN185, DNifA, HsglnBDNifA, HsglnKDNifA, EcglnBDNifA, AbGlnBDNifA, AbdeltaTGlnBDNifA, AbGlnZDNifA, AbB91ZDNifA, AbZ48BDNifA, pAAS1532, e pAAS1516, respectivamente.

abGlnZ, a única das seis proteínas PII incapaz de ativar NifA, é a segunda proteína do alinhamento. “Consensus” refere-se à sequência consenso entre as seis proteínas, evidenciando os resíduos que são idênticos em todas elas. As posições em que o resíduo presente em abGlnZ é diferente daquele presente em qualquer uma das outras proteínas do alinhamento estão marcadas com um asterisco (* - posições 5, 21, 22, 23, 31, 42, 45, 52, 54, 61, 66, 70, 94, 96, 108, 109, e 110). Alinhamento gerado no programa MEGA5, imagem gerada no programa BioEdit.

A família PII é bastante conservada em Proteobacteria, e as seis proteínas alinhadas possuem 54% de identidade (61/112). Dentre as posições em que há divergência, em 17 das 51 (33%) a proteína abGlnZ possui um resíduo único, não compartilhado com nenhuma das demais cinco proteínas. Sete destes resíduos (5, 21, 22, 23, 31, 42, e 45) localizam-se anteriormente ao resíduo 48, e entre eles possivelmente encontram-se um ou mais resíduos essenciais para a ativação de hsNifA por PII. Destes, o resíduo 42 pode seguramente ser desconsiderado, uma vez que se observou que hsGlnK H42Q possui comportamento idêntico a hsGlnK selvagem.

Os 17 resíduos em que abGlnZ diverge de todas as cinco outras proteínas PII analisadas foram localizados na estrutura cristalográfica de GlnZ de *A. brasilense* (PDB 3MHY, TRUAN *et al.*, 2010), e estão mostrados na figura 21. Os sete resíduos diferenciais localizados a montante do resíduo 48 estão mostrados em magenta, e os dez resíduos a jusante estão marcados em azul.

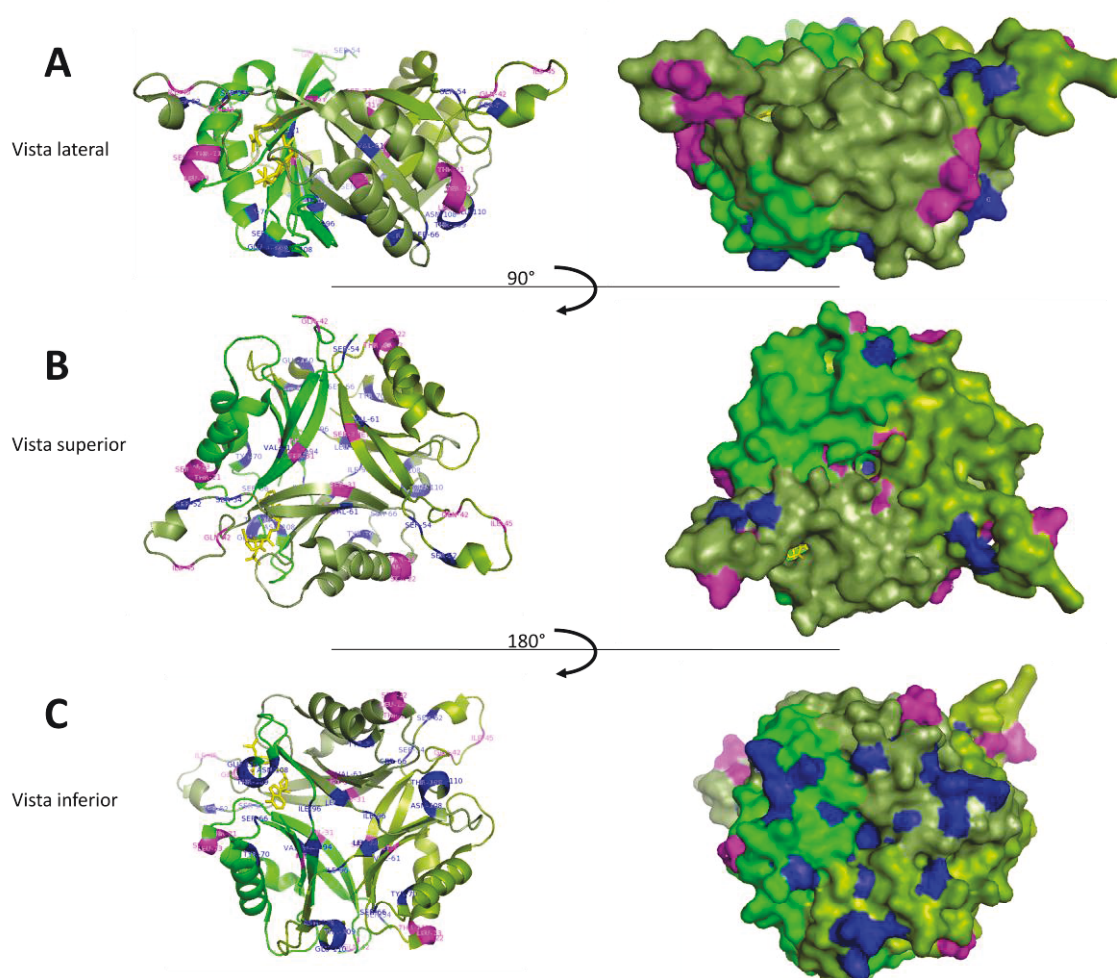


Figura 21 - Localização dos resíduos de aminoácidos diferenciais entre abGlnZ e as demais proteínas PII avaliadas (hsGlnB, hsGlnK, ecGlnB, AbGlnB, avGlnK) na estrutura de abGlnZ (PDB 3MHY).

Os resíduos 5, 21, 22, 23, 31, 42, e 45 estão marcados em **magenta**, e os resíduos 52, 54, 61, 66, 70, 94, 96, 108, 109, e 110 estão coloridos em **azul**. abGlnZ está mostrada tanto como modelo de estrutura secundária (imagens à esquerda), quanto como modelo de superfície (imagens à direita). (A), visão lateral do trímero de PII, com destaque para o sítio de interação com ATP e 2OG. (B), visão superior, mostrando a face da proteína que contém a projeção do T-loop. (C), visão inferior, mostrando a face oposta ao T-loop.

Dentre os resíduos de interesse, os resíduos 5 e 61 encontram-se completamente enterrados na cadeia polipeptídica, e os resíduos 31 e 94 contribuem pouco para a superfície exterior do trímero. Dentre os sete resíduos mais promissores, três (21, 22, 23) localizam-se na superfície lateral do trímero, um (31) localiza-se na face superior (embora sua contribuição a essa superfície seja pequena), e apenas um (45 – o resíduo 42 pode ser omitido, pois já foi avaliado) localiza-se no T-loop. Os resíduos diferenciais à jusante da posição 48 (que não se espera serem importantes para a diferença de atividade) tendem notavelmente a concentrarem-se na face inferior do trímero, com exceção de 52 e 54, que fazem parte do T-loop – mas o papel destes resíduos de abGlnZ já foi estudado anteriormente (STEFANELLO, 2014), e sua introdução na proteína hsGlnK não provoca

alterações do fenótipo de ativação de hsNifA. Estes dados sugerem que a superfície de interação entre PII e hsNifA poderia estar localizada ou na lateral do trímero de PII, ou na superfície superior; mas provavelmente não na face inferior do trímero.

5.1.9. Mutagênese aleatória de GlnK

O trabalho de obtenção de mutantes aleatórios de GlnK com reduzida capacidade de ativar NifA também foi iniciado durante meu trabalho de mestrado (STEFANELLO, 2014), no qual se havia identificado nove mutantes pontuais. A continuação deste trabalho permitiu identificar 18 mutantes pontuais adicionais.

O método de seleção de mutantes aleatórios baseia-se na capacidade de hsNifA de ativar a transcrição de *nifH::lacZ* somente se ativada por PII. Quando hsNifA e hsGlnK são expressas em células de *E. coli* contendo a fusão *nifH::lacZ*, a ativação de hsNifA por PII leva à transcrição da enzima β -galactosidase, cuja atividade pode ser quantificada em culturas líquidas de *E. coli* ou observada visualmente em colônias de *E. coli* cultivadas em meio sólido contendo Xgal. A degradação de Xgal pela β -galactosidase e a posterior oxidação do produto de degradação levam a colônia a adquirir cor azul. Inversamente, a ausência de hsGlnK ou a presença de uma variante inativa de hsGlnK conduzem à inatividade de hsNifA, com conseqüente ausência de atividade de β -galactosidase, tornando a colônia branca mesmo na presença de Xgal. Deste modo, células contendo hsGlnK selvagem e hsGlnK com mutações que a tornam incapaz de ativar hsNifA podem ser distinguidas em placas de Petri.

Para a realização do experimento de mutagênese aleatória, o plasmídeo pEMB200 foi usado como DNA molde para uma reação de PCR de baixa fidelidade empregando os *primers* T7F grd e T7term grd (ver seção 4.7.4, p. 89). O produto de PCR obtido foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI, e ligado ao plasmídeo HsglnKDNifA cortado com as mesmas enzimas. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* JM109(λ DE3) pRT22. As colônias resultantes foram riscadas em LA contendo cloranfenicol, ampicilina, Xgal e 5 μ M IPTG. Uma vez que a proteína hsGlnK intacta ativa a proteína hsNifA nessas condições, plasmídeos contendo a cópia selvagem de *glnK* ou genes com mutações irrelevantes levariam as células a adquirir coloração azul (oriunda da atividade de β -galactosidase transcrita por hsNifA a partir da fusão *nifH::lacZ*); por isso, selecionou-se colônias brancas ou azul-claras para análise, pois eram estas as colônias que tinham chance de conterem plasmídeos com mutações inativadoras de PII (dito de outra forma, neste experimento, buscou-se por mutações que gerassem perda de função de hsGlnK, avaliada através da perda de atividade de hsNifA, medida pela ausência de atividade de β -galactosidase).

As colônias de interesse foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos e para avaliação da atividade de β -galactosidase sob condições de superexpressão. Os plasmídeos foram seqüenciados com o *primer* DuetDOWN1.

Eventualmente, dentre mais de 3000 colônias avaliadas, encontrou-se um total de 27 mutações pontuais distintas de hsGlnK que diminuíram ou aboliram a capacidade de ativação de NifA. As substituições identificadas e os valores médios obtidos dos experimentos de β -galactosidase em meio líquido de cada mutante são apresentados na tabela 9. Valores em **negrito** indicam níveis de atividade semelhantes às do controle positivo (hsGlnK + hsNifA), e valores sublinhados indicam atividade inferior à do controle positivo, porém superior à do controle negativo.

TABELA 9 – MUTANTES INATIVADORES DE hsGlnK

Substituição	Atividade em 20 mM NH ₄ Cl (unidades Miller)	Atividade em 0 mM NH ₄ Cl (unidades Miller)	Observações quanto à estrutura	Outras observações
[Controle negativo] ¹	12,07	20,97		
[Controle positivo] ²	1000,43	1688,69		
M1V	811,24	2090,44	Exposto na superfície inferior	
K2E	23,41	<u>401,74</u>	Exposto na superfície inferior	
L3P	8,18	91,21	Não exposto	
I4N	3,91	13,74	Não exposto	
I4T	11,53	<u>211,08</u>	Não exposto	
I4T G84D	8,14	61,51	Resíduo 4 não-exposto; G84D em um loop próximo ao sítio de ligação a efetores	Mutante simples I4T disponível
T5R D54G	14,23	17,86	Resíduo 5 não exposto; resíduo 54 exposto no T-loop	D54N disponível em outro mutante
P10L	23,48	<u>458,48</u>	Exposto na superfície superior; presente no início de uma α -hélice	P10S disponível em outro mutante
P10S	46,72	<u>231,27</u>	Exposto na superfície superior; presente no início de uma α -hélice	P10L disponível em outro mutante
D14G	13,51	72,12	Exposto na superfície superior; presente em uma α -hélice	
G27S	5,95	33,49	Não exposto, presente em um loop	
T29A	13,89	925,18	Não exposto, localizado em folha beta, cadeia lateral voltada para o	

			sítio de interação com efetores	
E32G	47,46	<u>603,66</u>	Exposto na superfície superior, em motivo de folha beta	
K34E	17,54	2,92	Exposto na superfície superior, localizado em folha beta; cadeia lateral voltada para o solvente	
G35S ³	6,12	27,71	Não exposto, parte do sítio de ligação a efetores	
G35D	6,26	12,87	Não exposto, parte do sítio de ligação a efetores	
F36L	15,93	34,88	Não exposto, parte do sítio de ligação a efetores	
G41S	14,51	26,49	Exposto na superfície superior, em um loop; possível interação com 2OG	
G41S K58R	0,00	0,00	Exposto na superfície superior, em um loop; possível interação com 2OG	G41S disponível em outro mutante; K58 é um resíduo crucial para interação com 2OG
D54N	43,32	35,64	Exposto no T-loop	Mutação D54S não provoca alteração de fenótipo em hsGlnK
F55L	<u>396,46</u>	985,78	Exposto no T-loop	
E75G ³	806,04	980,39	Exposto na face lateral; resíduo 75 faz parte de uma α -hélice	
K85M	32,52	<u>789,77</u>	Exposto na face lateral superior, em um loop	
D88G	5,00	<u>302,81</u>	Não exposto, parte do sítio de ligação a efetores, presente em um loop	
D88N	4,31	<u>272,73</u>	Não exposto, parte do sítio de ligação a efetores, presente em um loop	
K90E ³	12,54	14,64	Não exposto, parte do sítio de ligação a efetores, presente em início de folha beta	
V99E	<u>238,97</u>	1060,47	Não exposto, parte do sítio de ligação a efetores, presente em folha beta	

¹*E. coli* JM109(λ DE3) pRT22 contendo o plasmídeo DNifA (expressa apenas hsNifA).

²*E. coli* JM109(λ DE3) pRT22 contendo o plasmídeo HsglnKDNifA (expressa hsNifA e hsGlnK).

³Encontrado em dois clones diferentes.

Como uma primeira observação, nota-se que não foram encontradas mutações individuais em nenhuma das sete posições diferenciais entre abGlnZ e as demais proteínas PII estudadas neste trabalho.

Em segundo lugar, é importante notar que nem todos os mutantes possuem o mesmo fenótipo; é possível distinguir quatro efeitos diferentes das mutações encontradas sobre a capacidade de hsGlnK de ativar hsNifA:

1. Abolição da atividade (L3P, I4N, I4T G84D,T5R D54G, D14G, G27S, K34E, G35S, G35D, F36L, G41S, G41S K58R, D54N, K90E).
2. Redução drástica da atividade, com atividade não detectada na presença de amônio (I4T, P10L, P10S, E32G, K85M, D88G, D88N).
3. Redução pequena da atividade, atividade detectável na presença de amônio (M1V, F55L, E75G, V99E).
4. Ausência de atividade na presença de amônio, alta atividade na ausência de amônio (T29A).

Os resíduos mutagenizados foram marcados na estrutura cristalográfica de abGlnZ (PDB 3MHY) para melhor visualizar sua localização em relação a regiões de importância conhecida em PII. A distribuição das substituições sugere que as mutações inativadoras não estão espalhadas de forma homogênea por todas as regiões da proteína (figura 22). A maioria das mutações expostas na superfície concentra-se na face superior, próxima do T-loop; em especial, as mutações com fenótipo mais drástico (marcadas em vermelho) encontram-se majoritariamente nesta face. Embora não seja uma prova definitiva, este fato sugere que esta pode ser a face de PII que efetivamente interage com hsNifA.

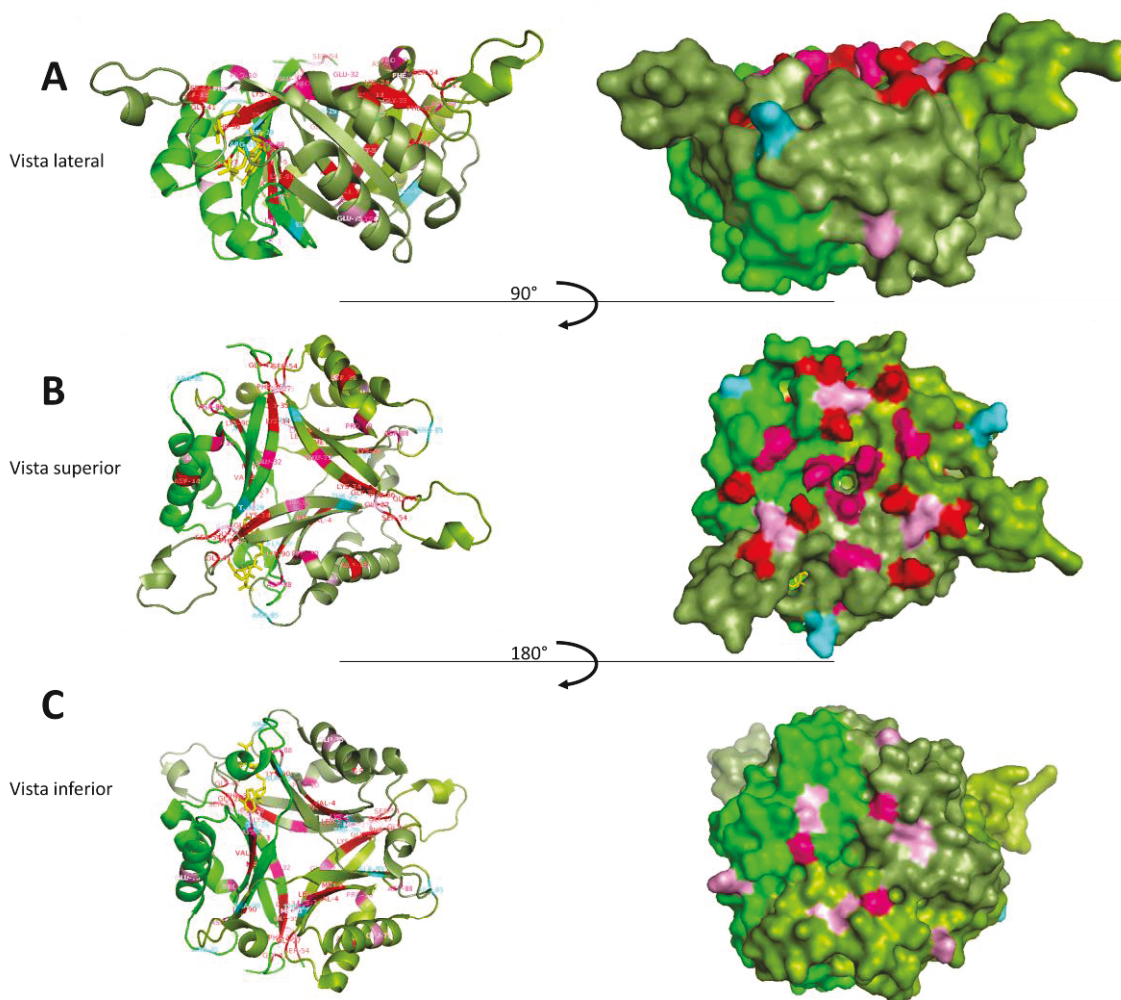


Figura 22 - Localização dos resíduos de aminoácidos substituídos durante o experimento de mutagenese aleatória na estrutura de abGlnZ.

Cores diferentes foram usadas para categorias diferentes de mutantes (ver texto): **vermelho**, substituições que abolem a atividade de hsGlnK; **magenta**, substituições que reduzem drasticamente a atividade de hsGlnK; **rosa**, substituições que reduzem fracamente a atividade de hsGlnK; **ciano**, a mutação T29A, que abole a ativação de hsNifA em alto nitrogênio em *E. coli*. abGlnZ está mostrada tanto como modelo de estrutura secundária (imagens à esquerda), quanto como modelo de superfície (imagens à direita). (A), visão lateral do trímero de PII, com destaque para o sítio de interação com ATP e 2OG. (B), visão superior, mostrando a face da proteína que contém a projeção do T-loop. (C), visão inferior, mostrando a face oposta ao T-loop.

O fenótipo mais comum foi a perda completa da capacidade de ativar hsNifA. As mutações responsáveis encontram-se amplamente distribuídas pela proteína, e estão presentes tanto em resíduos expostos quanto enterrados, tanto próximos quanto distantes do sítio de interação com efetores. Nove dos 15 mutantes nesta categoria possuem mutações envolvendo a substituição de (e por) prolina ou glicina, que se acredita causarem alterações mais drásticas nos motivos de estrutura secundária; três mutantes possuem substituições que invertem a carga do resíduo, três restantes possuem ganho de carga na posição, dois possuem perda de carga, três possuem mudanças simples de polaridade, e um (F36L) possui uma alteração na aromaticidade da cadeia lateral. No geral,

é difícil distinguir um padrão entre os membros deste grupo. Dentre os 15 mutantes, talvez o que mais se destaque seja D54N; esta foi a única substituição no T-loop a abolir a ativação de hsNifA por PII, o que é notável, visto que este é um dos resíduos diferenciais entre abGlnZ e as demais proteínas PII estudadas neste trabalho – mas a substituição D54S, que converte o resíduo 54 de hsGlnK para seu equivalente em abGlnZ, não inativa hsGlnK (STEFANELLO, 2014).

O segundo fenótipo mais comum foi a redução drástica da atividade, com 7 mutações distintas (duas no mesmo resíduo). Quatro dos resíduos deste grupo estão expostos na superfície superior do trímero de PII; é possível que essas mutações reduzam a afinidade de hsGlnK por hsNifA. As duas mutações no resíduo D88, que faz parte do sítio de interação com efetores, podem ter seu fenótipo explicado tentativamente por uma redução da afinidade de hsGlnK por 2OG. A substituição mutante I4T encontra-se enterrada no trímero de PII, e seu efeito deve incidir sobre a estruturação de PII (o que pode indiretamente causar tanto perda de afinidade por 2OG quanto mudanças na superfície de interação com hsNifA). É interessante notar que o resíduo I4 também foi mutagenizado para asparagina nesta mesma biblioteca, resultando em completa perda da atividade de hsGlnK.

A terceira categoria inclui quatro mutantes (M1V, F55L, E75G, V99E) que, embora tenham sido obtidos de colônias brancas selecionadas em placa, contêm variantes de hsGlnK pouco prejudicadas quanto à ativação de hsNifA. M1V provavelmente causa apenas uma diminuição da expressão de hsGlnK, o que explicaria seu fenótipo de baixa atividade em placa (sob fraca indução com 5 μ M de IPTG) e alta atividade em meio líquido (sob forte indução com 500 μ M de IPTG). V99E está próximo do sítio de ligação a efetores, e pode ter influência sobre sua afinidade. F55L, um mutante no T-loop, pode ter apenas uma afinidade ligeiramente mais baixa por hsNifA – embora a diferença não seja significativa o bastante para justificar considerá-lo um resíduo essencial para a interação com hsNifA. Por fim, E75G, a única mutação inegavelmente localizada na face lateral do trímero, não causa um fenótipo drástico; isso parece evidência de que a região em que ela se encontra não deve, definitivamente, estar diretamente envolvida na interação com hsNifA.

5.1.10. Discussão: regulação de hsNifA por PII, e regiões de PII importantes para a ativação de hsNifA

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho sugerem que a ativação de hsNifA por hsGlnK é desencadeada primariamente pela interação de hsGlnK com 2OG, o metabólito cuja alta concentração intracelular sinaliza a ausência de amônio na célula (HUERGO e DIXON, 2015), e cuja concentração em *H. seropedicae* atinge em torno de 4,5 mM em células cultivadas sob limitação de amônio (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A uridililação de hsGlnK parece não ter efeito direto sobre a atividade de hsNifA.

5.1.10.1. Papel da uridililação de PII na ativação de hsNifA

A observação de ativação de hsNifA por hsGlnK Y51F, um mutante não-uridililável, indica que a uridililação de PII não é necessária para a estimulação da atividade de hsNifA. Isto está em forte contraste com o que se sabe sobre a regulação de NifA em outros organismos que possuem ativação direta de NifA por PII, como *A. brasilense* (ARAÚJO *et al.*, 2004) e *R. rubrum* (ZHANG *et al.*, 2001), e é remanescente da regulação de NifL por GlnK em *K. pneumoniae* (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004).

Uma vez que a uridililação de hsGlnK não é diretamente importante para a ativação de hsNifA, qual sua função? O mais provável é que a uridililação de hsGlnK seja indiferente para a regulação de hsNifA, porém importante para a regulação de outras proteínas alvo com as quais GlnK venha a interagir – notoriamente, a interação com o canal de amônio AmtB, que em *E. coli* é desestimulada pela uridililação de GlnK (COUTTS *et al.*, 2002). Outra possibilidade é a de que mesmo que a uridililação de hsGlnK não tivesse qualquer relevância fisiológica, ela poderia ocorrer devido à incapacidade de GlnD de discriminar entre hsGlnK e hsGlnB – nesta última, o estado de uridililação é importante para regular seu principal alvo, NtrC, em *E. coli* (ATKINSON *et al.*, 1994).

Alternativamente, é possível especular sobre prováveis efeitos indiretos da uridililação de hsGlnK sobre a regulação de hsNifA. O gene *hs glnK* é co-transcrito com *amtB*, que codifica um transportador de amônio regulado por GlnK (NOINDORF *et al.*, 2005). Na presença de altas concentrações de amônio (e portanto, baixas de 2OG), hsGlnK não-uridililada interage com AmtB (HUERGO *et al.*, 2010), presumivelmente bloqueando o canal tal como ocorre em *E. coli* (CONROY *et al.*, 2007); esta interação tem também o efeito de seqüestrar GlnK para a membrana celular, deixando-a indisponível para interagir no citoplasma. É possível que a uridililação de hsGlnK por GlnD tenha por função secundária regular a disponibilidade de hsGlnK no citoplasma; isso poderia ter efeitos importantes sobre a ativação de hsNifA, uma vez que esta proteína parece ser bastante dependente de alta concentração de PII citoplasmática.

É curioso observar que a ativação de hsNifA na ausência de amônio foi mais elevada na presença de hsGlnK Y51F do que de hsGlnK selvagem quando os níveis de expressão foram baixos (figura 13). Uma possível explicação para isso é a diferença de afinidade de hsGlnK não-uridililada e hsGlnK uridililada por pelo domínio GAF de hsNifA, observada por Oliveira e colaboradores (2012) em ensaios de proteólise limitada; hsGlnK uridililada possui menos afinidade por hsNifA. A influência da ligação de hsGlnK a 2OG não parece ser relevante, visto que tanto hsGlnK quanto hsGlnK-UMP₃ possuem basicamente a mesma afinidade por 2OG na presença de ATP (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Por fim, há a possibilidade de a uridililação servir de reforço do sinal detectado pela ligação a 2OG; esta possibilidade é melhor explicada na subseção seguinte.

5.1.10.2. Papel dos efetores de PII na ativação de hsNifA

Os resultados obtidos com os mutantes K58M e G89A deixam claro que a interação de PII com ATP é absolutamente essencial para a ativação de hsNifA por PII, e que a interação de PII com 2OG é o principal desencadeador da ativação de hsNifA. O monitoramento da concentração intracelular de 2OG é a maneira direta de PII detectar a baixa concentração de amônio intracelular: altas concentrações de 2OG implicam baixa concentração de nitrogênio disponível (HUERGO e DIXON, 2015). A ausência de efeitos diretos da uridililação de hsGlnK sobre a ativação de hsNifA fortalece ainda mais a proposta de 2OG como o principal responsável pela regulação de hsNifA.

Uma pequena dificuldade é explicar a atividade residual de hsGlnK K58M em baixa concentração de amônio quando superexpressa em *E. coli*, especialmente em se considerando que hsGlnK K58M não possui qualquer afinidade por 2OG (ver seção 5.1.6); a despeito disto, algum sinal do nível de nitrogênio intracelular está sendo detectado por hsGlnK K58M em *E. coli*. É possível especular que este sinal seja a uridililação de hsGlnK K58M – já que, surpreendentemente, esta proteína revelou ser parcialmente uridililável. Neste caso, o modelo de regulação assumiria que a uridililação de hsGlnK age como um reforço do sinal de ausência de nitrogênio, que é transmitido majoritariamente pela presença de 2OG.

5.1.10.3. Resíduos de PII envolvidos na ativação de hsNifA

Nem a avaliação de diferentes proteínas PII, nem de proteínas quiméricas, nem de mutantes pontuais, nem de mutantes aleatórios permitiu identificar com certeza os resíduos e regiões de PII responsáveis pela ativação de hsNifA; no entanto, estes experimentos deram base para sugerir que a superfície de interação com PII é a face superior do trímero de PII (a face proximal ao T-loop). Esta hipótese é apoiada pela constatação de que (1) dentre as mutações aleatórias expostas na superfície de PII, quase todas localizam-se na face superior do trímero; e (2) os experimentos com as quimeras de abGlnB e abGlnZ estabeleceram que as diferenças entre PII ativadoras e PII incapaz de ativar hsNifA (abGlnZ) devem estar entre os primeiros 48 resíduos, e estes resíduos formam uma parte considerável da face superior do trímero de PII (e quase não estão presentes na face inferior).

O papel do T-loop parece ser secundário na ativação de hsNifA. Duas mutações previamente estudadas (V52S e D54S) não alteraram a ativação de hsNifA; das quatro mutações relatadas aqui (Y51F, H42Q, D54G, F55L), somente D54G impediu a ativação de hsNifA.

5.2. ESTUDO DA INIBIÇÃO DE NifA POR SEU DOMÍNIO GAF

5.2.3. Justificativa e planejamento

Tentativas de mutagênese sítio dirigida de hsNifA foram pouco promissoras (AQUINO *et al.*, 2015), em parte devido à pouca identidade entre as proteínas NifA (especialmente no domínio GAF) e em parte devido à ausência de dados estruturais e à pouca compreensão de seu mecanismo de ativação. Por isso, para tentar entender o papel do domínio GAF na regulação de hsNifA por PII em resposta a amônio, um dos objetivos deste trabalho foi realizar a mutagênese aleatória do referido domínio GAF de hsNifA e selecionar mutantes de acordo com o fenótipo conferido a hsNifA.

Para fins de triagem em *E. coli*, é importante notar que uma mutação que altere a regulação de hsNifA pode causar dois fenótipos distintos:

1. Fenótipo de ganho de função (mutação ativadora): a mutação permite a hsNifA ativar transcrição independentemente de PII (e provavelmente, independentemente da concentração de amônio).
2. Fenótipo de perda de função (mutação inativadora): a mutação impede hsNifA de ser ativada mesmo na presença de PII¹⁵.

O fenótipo de ganho de função pode ser detectado em *E. coli* contendo a fusão *nifH::lacZ*, pois confere cor azul às colônias em meio sólido na presença de Xgal quando apenas hsNifA, sem nenhuma proteína PII adicional, for expressa a partir de um plasmídeo. O fenótipo de perda de função pode ser detectado como descrito na seção 5.1.9, que tratou da mutagênese de hsGlnK: este tipo de mutação confere cor branca a células de *E. coli* contendo a fusão *nifH::lacZ* cultivadas em meio sólido na presença de Xgal quando tanto hsNifA quanto hsGlnK são expressas na célula a partir de um plasmídeo. Uma representação esquemática da seleção dos dois fenótipos é dada na figura 23:

¹⁵ Em teoria, existe a possibilidade de uma mutação gerar um dos fenótipos aqui descritos através de alteração da afinidade de NifA pelo promotor *nif*. Não se espera que isto ocorra, porém, com mutações localizadas nos domínios modulares N-terminal e central, que não estão diretamente envolvidos em interação com DNA. A deleção do domínio N-terminal inteira não teve efeito negativo sobre a afinidade de $\Delta(1-203)$ NifA (MONTEIRO *et al.*, 2001).

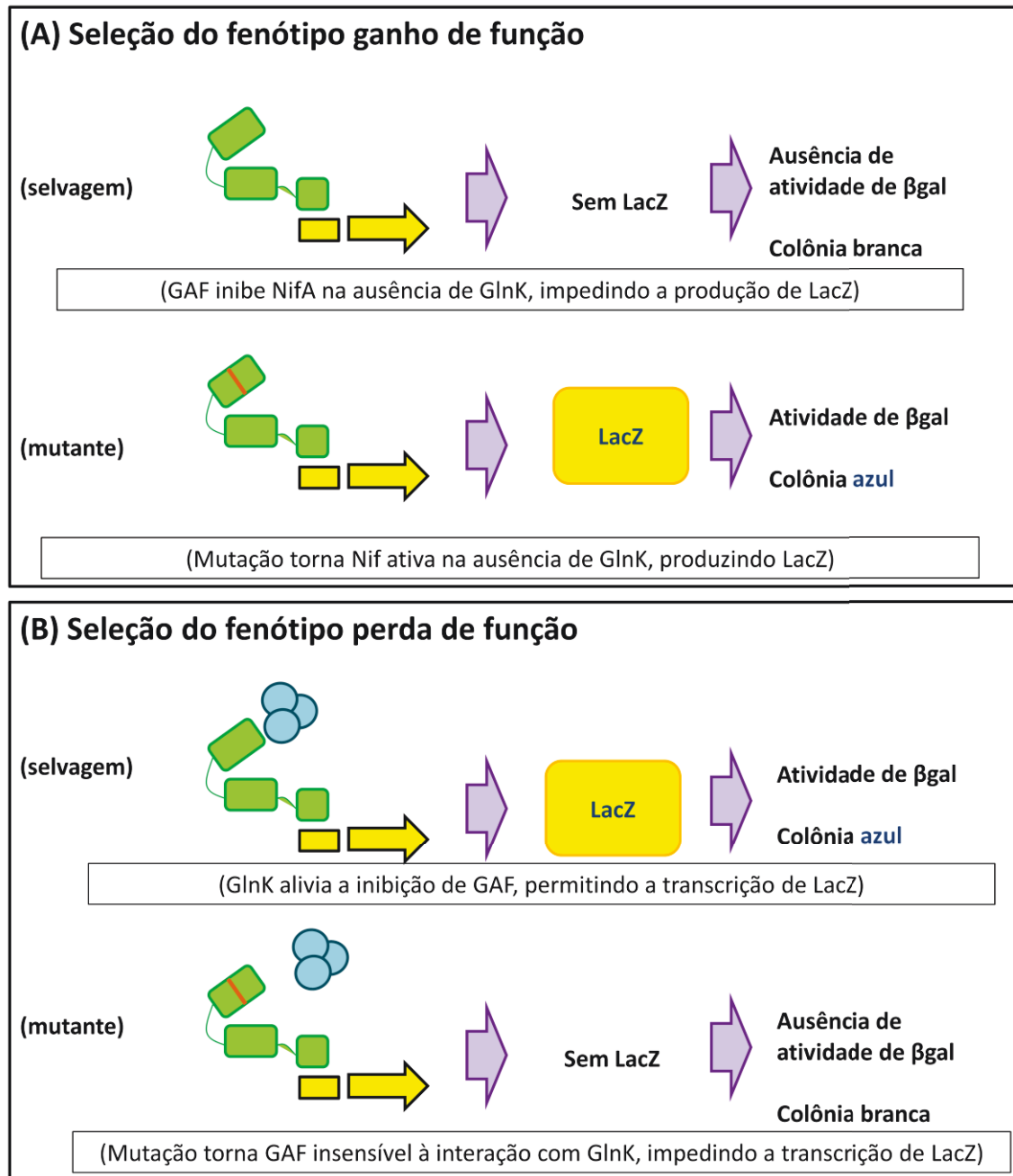


Figura 23 - Representa  o gr  fica da sele  o de mutantes de GAF.

Em (A), NifA expressa sozinha em *E. coli* n  o    capaz de ativar a transcri  o de *nifH::lacZ*, impedindo que a col  nia metabolize Xgal, mantendo a cor branca; a ocorr  ncia de uma muta  o ativadora permite a NifA ser ativa mesmo na aus  ncia de PII, levando    transcri  o de *lacZ*, atividade de β -galactosidase, degrada  o de Xgal, e colora  o azul da col  nia que a expresse. Em (B), NifA coexpressa com PII em *E. coli* ativa a transcri  o de *nifH::lacZ*, levando    degrada  o de Xgal e aparecimento de cor azul nas c  lulas; uma muta  o inativadora levaria hsNifA a resistir    ativa  o por PII, mantendo a col  nia com a cor branca.

5.2.4. Construção do vetor Dxho* e de plasmídeos com a construção *nifA*[*xho*I]

Para poder mutagenisar apenas a região 5' do gene *nifA*, correspondente ao domínio GAF, foi necessário introduzir no gene *hs nifA* um sítio de restrição único para separar a região codificadora do domínio GAF propriamente dito (bases 1-555, resíduos 1-185) do restante da seqüência. A escolha da enzima apropriada e das substituições silenciosas necessárias foi feita com o auxílio da ferramenta WatCut. Após considerar as diversas possibilidades, optou por introduzir um sítio *Xho*I através das mutações G570C, C573G, e C574A (resíduos 190-191).

Para isso, o plasmídeo pRAM1T7 (STEFANELLO, 2011) foi digerido com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI, e o inserto contendo o gene *hs nifA* foi transferido para pET29a digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo R129. Este plasmídeo foi usado como DNA molde para dois sistemas de PCR: um contendo os *primers* T7F *grd* e *nifAXho*I rev, e o outro contendo os *primers* *nifAXho*I fwd e T7term *grd*. O sucesso da amplificação foi confirmado por eletroforese de DNA. Meio microlitro de cada uma das reações supracitadas foi usado como DNA molde para uma nova reação de PCR contendo os *primers* T7F *grd* e T7term *grd*, em um volume final de 25 µL. O produto desta reação foi ligado diretamente a pTZ57R/T e transformado em *E. coli* TOP10. Colônias que apresentassem cor branca quando cultivadas em LA + Ap na presença de Xgal tiveram seus plasmídeos extraídos e avaliados por restrição com *Xba*I/*Bam*HI; um plasmídeo contendo um fragmento de tamanho correto foi selecionado e seqüenciado para confirmar a presença do inserto correto com somente as mutações G570C, C573G, e C574A. Este plasmídeo foi denominado *nifAxho*TZ. *nifAxho*TZ foi digerido com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI, e o inserto contendo o gene *hs nifA*[*xho*I] foi transferido para pET29a digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo *nifAxho*29. Este último plasmídeo expressa *hsNifA* a partir do promotor *T7/lacO* em *E. coli*. A presença das três mutações silenciosas não teve efeito detectável sobre a expressão de *hsNifA* (dados não mostrados).

Uma vez que os plasmídeos da série pET usados neste trabalho (pET28a, pET29a, pETDuet1) possuem todos um sítio *Xho*I à jusante do sítio de policlonagem, nenhum pôde ser utilizado para a clonar um fragmento na região que codifica o domínio GAF de *NifA* usando a enzima *Xho*I. Para contornar esta dificuldade, foi preciso construir um vetor derivado de pETDuet1 com o sítio *Xho*I destruído. O plasmídeo pETDuet1 foi digerido com *Xho*I e tratado com T4 DNA polimerase (Thermo Scientific), conforme descrito (4.7.8, p. 92), ligado a si mesmo e transformado em *E. coli* TOP10. Um total de 12 colônias resistentes a ampicilina teve seus plasmídeos extraídos e avaliados por restrição com *Xho*I, e um plasmídeo resistente à digestão por esta enzima foi seqüenciado com o *primer* T7 promotor para confirmar a destruição do sítio de restrição. Este plasmídeo, que contém uma inserção

de timidina entre as bases do sítio (CTTCGAG), foi denominado Dxho*. Dxho* é um vetor de expressão idêntico a pETDuet1, exceto pela ausência do sítio *Xho*I.

O plasmídeo pEMB200 foi então usado como DNA molde para uma PCR usando os *primers* T7F *grd* e pET28aKpn rev2 (K-B-S-S), gerando um produto de amplificação contendo a região promotora de pET29a, o gene *hs glnK*, e um sítio *Kpn*I na região 3'. Este produto de PCR foi purificado, digerido com *Nde*I e *Kpn*I, e ligado a Dxho* digerido com as mesmas enzimas. As ligações foram transformadas em *E. coli* TOP10, e as colônias resistentes a ampicilina foram cultivadas em meio líquido para a extração de plasmídeos e confirmação da inserção do gene *hs glnK* por restrição com *Xba*I e *Kpn*I. A ausência de mutações indesejadas no inserto foi confirmada através de seqüenciamento com os *primers* T7term *grd* e DuetUP2. O novo plasmídeo foi denominado Dxho*K, e expressa hsGlnK a partir do segundo promotor *T7/lacO* de pETDuet1.

O plasmídeo nifAxho29 foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI, e o inserto contendo o gene *hs nifA* foi transferido para Dxho* digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo nifAxhoDxho*. Este plasmídeo pôde ser usado para um primeiro experimento de mutagênese aleatória do domínio GAF de hsNifA.

5.2.5. Primeira tentativa de mutagênese aleatória de hsNifA

Inicialmente, tentou-se introduzir os fragmentos codificantes para o domínio GAF aleatoriamente mutagenizado no plasmídeo nifAxhoDxho*. O plasmídeo nifAxho29 foi usado como DNA molde para uma reação de PCR de baixa fidelidade empregando os *primers* T7F *grd* e T7term *grd* (ver seção 4.7.4, p. 89). O produto de PCR obtido foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Xho*I, e ligado ao MCSI do plasmídeo nifAxhoDxho* cortado com as mesmas enzimas. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* JM109(λDE3) pRT22, e as colônias resultantes foram riscadas em LA contendo cloranfenicol, ampicilina, Xgal, e 5 μM IPTG. Uma vez que, na ausência de proteína PII expressa heterologicamente, a proteína hsNifA selvagem não possui atividade nessas condições, plasmídeos contendo um gene *nifA* sem mutações ou com mutações irrelevantes levariam as células a permanecerem brancas na presença de Xgal; por isso, selecionou-se colônias azuis para análise, uma vez que elas tinham maior probabilidade de conterem plasmídeos com mutações ativadoras de hsNifA. Dito de outra forma, buscou-se por mutações que gerassem ganho de função de hsNifA, medida pela presença de atividade de β-galactosidase na ausência de PII heteróloga. As colônias de interesse foram inoculadas em meio LB para extração de plasmídeos e para avaliação da atividade de β-galactosidase sob condições de superexpressão. Os plasmídeos foram seqüenciados com o *primer* pET upstream.

Duas dificuldades foram encontradas durante esta tentativa de realizar mutagênese aleatória do domínio GAF de hsNifA: primeiramente, a sensibilidade de hsNifA ao oxigênio

torna-a inativa quando expressa em colônias de *E. coli* em meio sólido, independente da presença de PII e de baixas concentrações de amônio; a concentração de O₂ é alta demais mesmo no interior da colônia. Isso impede que a triagem de células contendo hsNifA ativa/inativa seja feita nas placas de transformação – é necessário riscar as colônias em uma nova placa contendo Xgal e IPTG, a fim de que o maior número de células crescendo no *patch* riscado diminua a concentração de O₂ intracelular, permitindo a ativação de NifA. Assim foi feito durante a seleção de mutantes aleatórios de hsGlnK (seção 5.1.9). O processo é trabalhoso e diminui o número total de clones que podem ser triados em tempo hábil. Em segundo lugar, houve o problema mais preocupante da aparição de falsos positivos durante a triagem. A tentativa de selecionar variantes de hsNifA com mutações no domínio GAF que a tornassem ativa independente da presença de PII levou à triagem de ~3000 mutantes, dentre os quais 16 apresentaram o fenótipo desejado em placa; nenhum deles continha qualquer mutação, nem apresentava atividade de β-galactosidase quando cultivado em meio líquido (dados não mostrados). Isto indica que o sistema de seleção empregado, por algum motivo, não é muito apropriado para detectar mutações de ganho de função.

Uma tentativa de cultivar as células em atmosfera sub-óxica (dentro de um vaso selado com uma vela acesa, para consumir parte do oxigênio) levou ao aparecimento de um número inaceitável de falsos positivos, e por isso a estratégia foi abandonada.

5.2.6. Construção de variantes de NifA insensíveis a oxigênio

5.2.6.1. Justificativa e planejamento

A fim de facilitar a seleção de variantes de hsNifA insensíveis a PII e/ou a amônio nos experimentos de mutagênese aleatória, decidiu-se construir uma variante de hsNifA insensível a oxigênio. Isso permitiria contornar o problema da triagem trabalhosa (não seria mais preciso riscar as colônias), e possivelmente aliviaria o problema da aparição de falsos positivos (pois o fenótipo de colônia azul seria mais distinguível da variação normal das colônias brancas).

Tal como nas demais proteínas NifA intrinsecamente sensíveis à oxidação, a regulação por oxigênio em hsNifA é independente do domínio GAF N-terminal (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999), e é atribuída à presença de um motivo de cisteínas localizado parcialmente no domínio central e parcialmente no linker ID da proteína, que poderia coordenar a formação de um cluster de ferro-enzofre sensível a O₂. A mutação C→S de cada uma das cisteínas supostamente envolvidas na sensibilidade a O₂ resulta em variantes de hsNifA completamente inativas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Afora isto, o mecanismo da sensibilidade a oxigênio não foi caracterizado em nenhuma proteína NifA

independente de NifL e não é compreendido em detalhes, de modo que não há uma estratégia clara para a remoção da sensibilidade a O_2 em NifA sem perturbação da regulação por amônio.

Considerou-se duas estratégias distintas para remover a sensibilidade de hsNifA por oxigênio: substituição de algum dos resíduos que se sabe serem importantes para a regulação por O_2 , e construção de uma proteína quimérica entre hsNifA e alguma proteína NifA insensível a oxigênio. Esta segunda estratégia pareceu mais promissora, uma vez que um trabalho anterior já demonstrou a viabilidade de construir proteínas quiméricas entre NifA de *H. seropedicae* e de *A. vinelandii* (avNifA) (OLIVEIRA *et al.*, 2009). De especial interesse é a quimera NifAQ1, que possui o domínio GAF de hsNifA e os demais domínios de avNifA e é insensível a oxigênio. Esta proteína, porém, não é regulada em resposta a nitrogênio da mesma maneira que hsNifA; sua atividade é alta na presença de íons amônio e é independente de ativação por PII, semelhante a avNifA. Por causa disso, a quimera NifAQ1 não pôde ser usada para os experimentos em questão, e a construção de novas proteínas quiméricas fez-se necessária.

Para os fins estabelecidos, a fusão ideal entre os genes *hs nifA* e *av nifA* seria aquela que produzisse uma proteína quimérica que atendesse os quatro critérios listados abaixo:

1. Ausência de sensibilidade a O_2 , para facilitar a triagem da atividade da proteína em placas de *E. coli*.
2. Inibição pelo domínio GAF de hsNifA na ausência de PII, caso contrário a seleção de mutações ativadoras torna-se impossível.
3. Ativação dependente de PII, à maneira de hsNifA, indicando que seu modo de regulação por amônio é semelhante ao da proteína selvagem.
4. Nível de atividade semelhante ao de hsNifA, para facilitar a detecção da atividade e comparação com os dados obtidos com a proteína selvagem

Em suma, buscou-se pela construção que mantivesse o máximo possível dos aspectos que caracterizam a regulação de hsNifA por amônio, ao mesmo tempo em que perdesse a sensibilidade a O_2 . Para aumentar a probabilidade de obter esta construção, estabeleceu-se três exigências para a escolha da região de junção entre hsNifA e avNifA:

1. O domínio GAF N-terminal de hsNifA deveria estar presente na sua totalidade, visto ser ele essencial para a repressão de NifA e o alvo dos experimentos de mutagenese aleatória.
2. O domínio central de hsNifA deveria ser preservado ao máximo nas proteínas quiméricas, dadas as evidências de regulação *in trans* do domínio GAF N-terminal

sobre os domínios AAA+ e HTH de hsNifA (MONTEIRO *et al.*, 1999) e da falta de regulação de NifAQ1.

3. Dada a possibilidade de perturbação estrutural, as junções entre as hsNifA e avNifA deveriam ser localizadas preferencialmente em regiões de estrutura secundária indefinida, ou no mínimo deveriam evitar alterar α -hélices e folhas- β .

5.2.6.2. Alinhamento de NifAs

Para selecionar a melhor região para a junção dos fragmentos das duas proteínas, um alinhamento foi construído a partir de 56 seqüências de genes *nifA* de Proteobacteria, incluindo *hs nifA* e *av nifA*. As seqüências dos genes foram obtidas da plataforma KEGG (KANEHISA *et al.*, 2017), traduzidas no programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011) e alinhadas usando o algoritmo ClustalW (CHENNA *et al.*, 2003) conforme descrito na seção 4.6.3 (p. 84). A parte mais relevante do alinhamento para esta seção pode ser vista na figura 24:

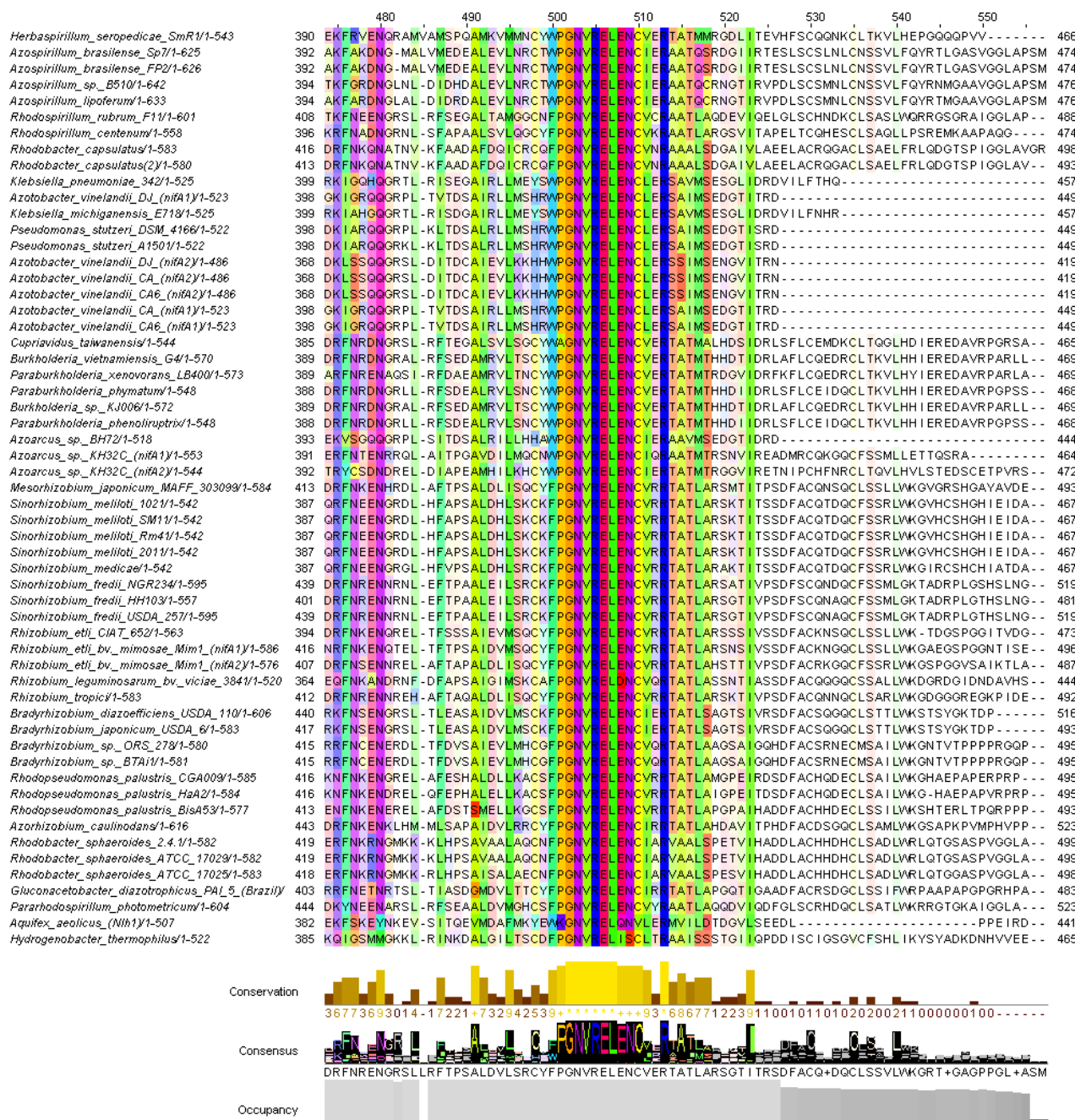


Figura 24 - Alinhamento de diversas proteínas NifA, destacando a região correspondente aos resíduos 390-466 de hsNifA (473-549 do alinhamento).

A primeira sequência é hsNifA. A região C-terminal do domínio central é bastante conservada entre as proteínas NifA até o equivalente ao resíduo 434 de hsNifA (518 do alinhamento); a partir daí, há uma clara divergência entre as proteínas sensíveis a oxigênio, como as de *H. seropedicae*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* e *Sinorhizobium*, e as proteínas insensíveis a oxigênio de *Azotobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*. Os resíduos cruciais de cisteína encontram-se nas posições 498, 510, 530, e 535 do alinhamento, equivalentes aos resíduos 414, 426, 446, e 451 de hsNifA. A figura foi gerada com o programa Jalview 2.10 (coloração Taylor, *conservation threshold* 20%). Conservation refere-se ao grau de conservação de uma determinada posição, Consensus é a sequência consenso do alinhamento (mostrada como sequência, histograma, e logo), e Occupancy é a porcentagem de sequências em que cada posição é ocupada por um resíduo (e não por um gap).

Conforme esperado, o alinhamento encontrou baixa similaridade entre os domínios GAF das diversas proteínas NifA, e alta similaridade entre os domínios AAA+ e C-terminal. As proteínas NifA sensíveis a oxigênio possuem a sequência característica de cisteínas (C-X₁₁-C-X₁₉-C-X₄-C) ausente nas proteínas insensíveis a O₂. Os primeiros 23 resíduos do cluster de cisteínas, porém, são compartilhados com alta similaridade entre todas as proteínas NifA, independente de seu modo de regulação; a similaridade começa a cair a jusante do resíduo 434 de hsNifA (equivalente ao resíduo 518 do alinhamento). A segunda cisteína do cluster, em particular, é conservada em todas as proteínas NifA analisadas (exceto a proteína Nih1 de *Aquifex aeolicus*). A sequência imediatamente à montante da primeira cisteína do cluster também é altamente conservada; isso tudo torna a região entre os resíduos 390 e 434 de hsNifA (equivalente aos resíduos 398-442 de avNifA, e aos resíduos 474-518 do alinhamento) ideal para a junção do segmento 5' de *hs nifA* com o segmento 3' de *av nifA*, segundo os critérios delineados.

O alinhamento também mostrou que além do segundo resíduo de cisteína do possível cluster de ferro-enzofre ser altamente conservado, a primeira cisteína do cluster apresenta certa regularidade de substituição nas proteínas NifA insensíveis a oxigênio: ela somente é substituída por histidina, tirosina, ou metionina. Isto visto, considerou-se a possibilidade de a substituição de C414 por serina (OLIVEIRA *et al.*, 2009) ter gerado uma variante inativa de hsNifA devido não à perda de organização do cluster, mas a problemas de estruturação no local. Decidiu-se tentar construir o mutante C414H de hsNifA, e verificar se esta proteína mutante perderia a sensibilidade a O₂.

5.2.7. Predição de estrutura secundária e desenho das quimeras

Para ajudar a selecionar os pontos exatos de junção entre as cadeias de hsNifA e avNifA, utilizou-se o programa JPRED (DROZDETSKIY *et al.*, 2015) para prever os motivos de estrutura secundária na região entre os resíduos 390-435 de hsNifA (398-442 de avNifA). A intenção foi evitar escolher pontos de junção preferencialmente dentro de motivos de estrutura secundária parecida. Os programas PSIPRED e GOR4 também foram utilizados, e atribuíram estruturas secundárias essencialmente idênticas às acima na região de interesse (resíduos 388-442 de hsNifA). Levando tanto a estrutura secundária quanto a similaridade geral da sequência em consideração, escolheu-se sete pontos de junção diferentes para a construção de proteínas quiméricas de hsNifA e avNifA. A localização das junções e a descrição das quimeras podem ser vistas na figura 25 e na tabela 10.

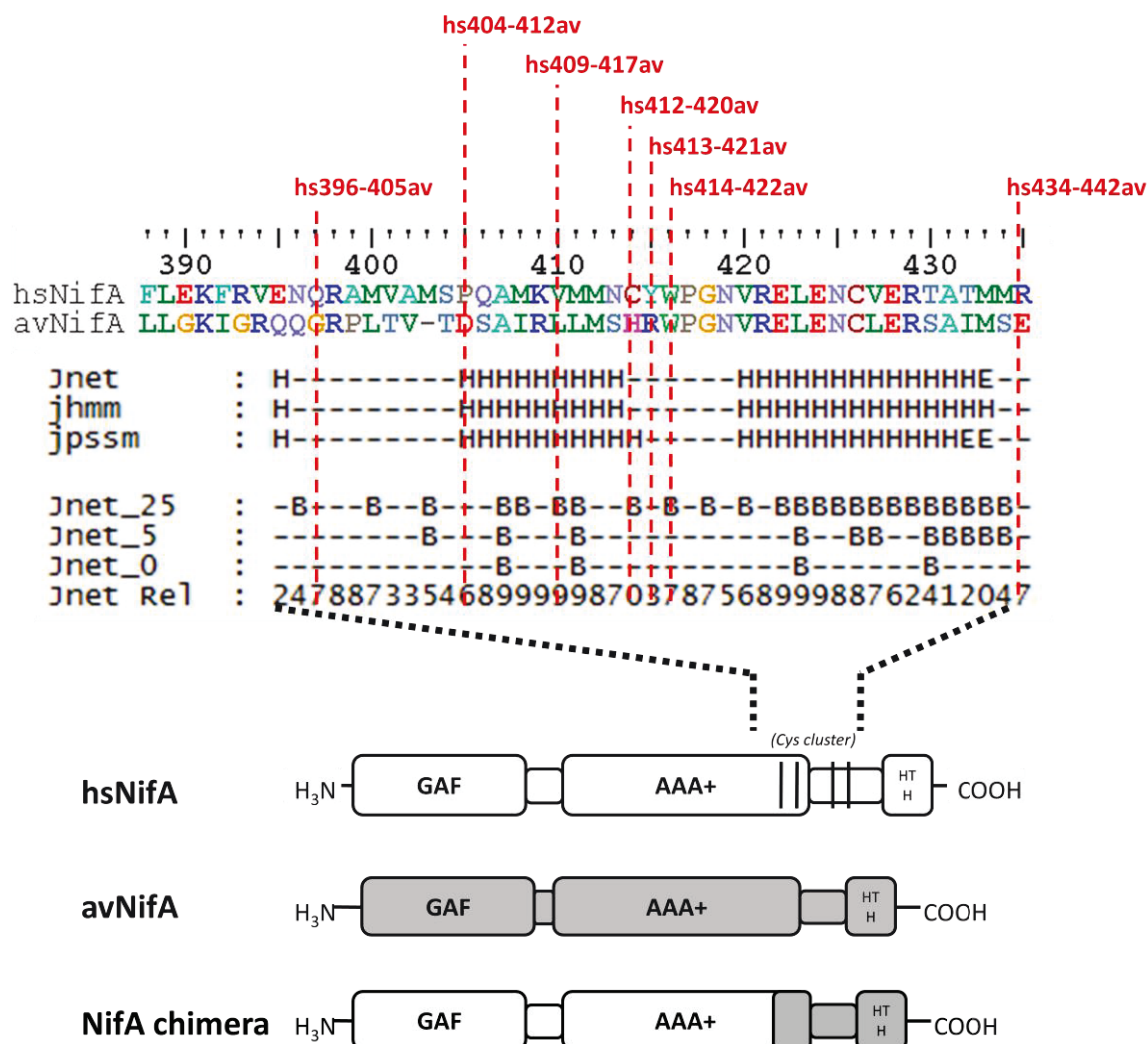


Figura 25 - Localização das regiões de junção entre hsNifA e avNifA.

A porção inferior da figura mostra representações esquemáticas de hsNifA, avNifA, e de uma quimera das duas proteínas, com destaque para o cluster de cisteínas. A parte superior mostra especificamente o alinhamento de hsNifA e avNifA na região entre os resíduos 388 e 435 de hsNifA, e a estrutura secundária predita para os resíduos 395-435 (H, hélice; E, estendido; B, enterrado, não exposto ao solvente; os números representam a confiança da predição). A fronteira entre os resíduos oriundos de hsNifA e de avNifA em cada quimera está representada por linhas verticais tracejadas.

TABELA 10 – DESCRIÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

Nome	Resíduos de hsNifA	Resíduos de avNifA	Primers específicos
hs396-405av	1-396 (ou 185-396)	405-522	hs396+405av fwd e hs396+405av rev
hs404-412av	1-404 (ou 185-404)	412-522	hs404-412av fwd e hs404-412av rev
hs409-417av	1-409 (ou 185-409)	417-522	hs409-417av fwd e hs409-417av rev
hs412-420av	1-412 (ou 185-412)	420-522	hs412-420av fwd e hs412-420av rev
hs413-421av	1-413 (ou 185-413)	421-522	hs413-421av fwd e hs413-421av rev
hs414-422av	1-414 (ou 185-414)	422-522	hs414-422av fwd e hs414-422av rev
hs434-442av	1-434 (ou 185-434)	442-522	hs434-442av fwd e hs434-442av rev

5.2.8. Construção dos plasmídeos codificando proteínas quiméricas N-truncadas

Inicialmente, optou-se por construir variantes N-truncadas ($\Delta(1-185)$; ausência do domínio GAF de hsNifA) das quimeras. Isso foi feito para poder avaliar mais facilmente a atividade das proteínas quiméricas em *E. coli*, uma vez que hsNifA não é ativa nesse organismo a menos que coexpressa com PII (STEFANELLO, 2014). $\Delta(1-185)$ hsNifA não apresenta regulação por amônio, mas mantém a regulação por oxigênio e é funcional em *E. coli* (MONTEIRO *et al.*, 1999; STEFANELLO, 2011). A construção de quimeras N-truncadas permite, portanto, avaliar a funcionalidade e resistência a O_2 dessas proteínas sem interferência da regulação por amônio. As quimeras foram construídas pelo método de OE-PCR (seção 4.7.5, p. 89), usando *primers* complementares entre si contendo a seqüência da região da junção desejada.

Para a construção de cada um dos genes quiméricos, o plasmídeo pETN185 (STEFANELLO, 2011) foi usado como DNA molde para sistemas de PCR contendo os *primers* T7F grd e o *primer* 3' (rev) associado a cada quimera (tabela 10); simultaneamente, o plasmídeo pRL293 foi usado com DNA molde para sistemas de PCR com os *primers* T7term grd e o *primer* 5' específico de cada quimera. O sucesso de cada amplificação foi confirmado por eletroforese de DNA.

Para cada gene quimérico em construção, meio microlitro da reação com os *primers* T7F grd – *primer* 3' foi unido a meio microlitro da reação com os *primers* 5' – T7term grd, e cada mistura resultante foi usada como molde para uma reação de PCR contendo os *primers* T7F grd e T7term grd, em um volume final de 50 μ L. O produto desta reação aplicado integralmente em gel de agarose para separação das bandas de diferentes tamanhos, e as bandas de tamanho adequado (~1500 pares de bases) foram extraídas do gel e purificadas. Os fragmentos recuperados foram digeridos com *Nde*I e *Bam*HI, ligados a pET29a digerido com as mesmas enzimas, e cada ligação foi transformada em *E. coli* TOP10. Colônias resistentes a kanamicina tiveram seus plasmídeos selecionados por PCR de colônia com os *primers* T7Fgrd e T7term grd; clones positivos (contendo bandas de ~1500 pares de bases) foram cultivados em LB para extração dos plasmídeos e confirmação da identidade dos insertos. Estes plasmídeos foram denominados pAAS1501, pAAS1502, pAAS1503, pAAS1504, pAAS1505, pAAS1506, e pAAS1609, e possuem os genes que codificam as versões N-truncadas ($\Delta 1-185$) de hs409-417av, hs412-420av, hs413-421av, hs4014-422av, hs396-405av, hs404-412av, e hs434-442av, respectivamente. Nestes plasmídeos, todas as proteínas quiméricas N-truncadas ($\Delta 1-185$) são expressas em *E. coli* a partir de seu próprio promotor *T7/lacO*.

O mutante pontual C414H de *hsNifA* também foi construído por mutagênese sítio-dirigida por oligonucleotídeos. O plasmídeo pETN185 foi usado como DNA molde para dois sistemas de PCR: um contendo os *primers* T7F grd e *hsnifA* C414H rev, e o outro contendo os *primers* *hsnifA* C414H fwd e T7term grd. O sucesso da amplificação foi confirmado por eletroforese de DNA. Meio microlitro de cada uma das reações supracitadas foi usado como DNA molde para uma nova reação de PCR contendo os *primers* T7F grd e T7term grd, em um volume final de 50 μ L. O produto desta reação aplicado integralmente em gel de agarose para separação das bandas de diferentes tamanhos, e a banda de tamanho correto (~1500 pares de bases) foi extraída do gel e purificada.

O fragmento purificado foi digerido com *NdeI* e *BamHI*, ligado a pET29a digerido com as mesmas enzimas, e a ligação foi transformada em *E. coli* TOP10. Colônias resistentes a kanamicina tiveram seus plasmídeos selecionados por PCR de colônia com os *primers* T7Fgrd e T7term grd; um clone positivo (contendo a banda de ~1500 pares de bases) foi cultivado em LB para extração do plasmídeo e confirmação da identidade do inserto. Este plasmídeo foi denominado pAAS1507, e expressa a proteína $\Delta(1-184)$ *hsNifA* C414H a partir de um promotor *T7/lacO* em *E. coli*.

Todos os plasmídeos mencionados foram transformados em *E. coli* JM109(λ DE3)pRT22 para determinação da atividade de β -galactosidase na presença de oxigênio sob baixa (5 μ M IPTG) e alta (500 μ M IPTG) expressão das variantes de *NifA*. Tendo constatado que todas as construções, exceto $\Delta(1-185)$ *hs434-442*, apresentavam atividade apreciável na presença de oxigênio (ver tabela 11), seguiu-se com a reintrodução do domínio GAF de *hsNifA* em todas as construções exceto *hs434-442*.

5.2.9. Construção dos plasmídeos codificando proteínas quiméricas e *hsGlnK*

O plasmídeo R129 (contém *hs nifA* clonado *NdeI/BamHI* em pET29a) foi digerido com *Apal*; os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, e o fragmento contendo a região promotora *T7/lacO* e a porção 5' do gene *hs nifA* foi extraído do gel e purificado. Os plasmídeos pAAS1501, pAAS1502, pAAS1503, pAAS1504, pAAS1505, pAAS1506 e pAAS1507 foram igualmente digeridos com *Apal* e desfosfatizados com SAP, e então analisados por eletroforese; mas no caso deles, o fragmento contendo a porção 3' do gene *nifA* (mais o restante do plasmídeo) é que foi extraído do gel e purificado. O fragmento extraído de R129 foi ligado a cada um dos fragmentos obtidos de pAAS1501, pAAS1502, pAAS1503, pAAS1504, pAAS1505, pAAS1506 e pAAS1507, e as ligações foram transformadas em *E. coli* TOP10. Colônias resistentes a kanamicina tiveram seus plasmídeos selecionados por PCR de colônia com os *primers* T7Fgrd e T7term grd; clones positivos (contendo bandas de ~1700 pares de bases) foram cultivados em LB para extração dos plasmídeos e confirmação da identidade dos insertos por restrição com *NotI* (há um sítio

na posição 1476 em *hs nifA*, mas não nas quimeras) e *Sall* (há dois sítios nas quimeras, em 455 e 1346, mas apenas em em *hsNifA*, em 455). Os plasmídeos com o padrão de restrição correto foram nomeados pAAS1518, pAAS1519, pAAS1520, pAAS1521, pAAS1522, pAAS1523, e pAAS1524, e possuem os genes que codificam *hs409-417av*, *hs412-420av*, *hs413-421av*, *hs4014-422av*, *hs396-405av*, *hs404-412av*, e *hsGlnK C414H*, respectivamente. Nestes plasmídeos, todas as proteínas quiméricas são expressas em *E. coli* a partir do promotor *T7/lacO*.

Para construir os plasmídeos para a coexpressão das quimeras com *hsGlnK*, os plasmídeos pAAS1518, pAAS1519, pAAS1520, pAAS1521, pAAS1522, pAAS1523, e pAAS1524 foram digeridos com as enzimas *XbaI* e *BamHI*, e ligados a DHsglnK cortado com as mesmas enzimas. As ligações foram transformadas em *E. coli* TOP10, e as colônias resistentes a ampicilina tiveram seus insertos selecionados por PCR com os *primers* T7F *grd* e DuetDOWN1. Colônias contendo os plasmídeos corretos (aqueles contendo bandas de ~1700 pares de bases detectadas por PCR) foram cultivadas em LB para extração dos plasmídeos. Estes plasmídeos foram nomeados pAAS1525, pAAS1526, pAAS1527, pAAS1528, pAAS1529, pAAS1530, pAAS1531, e possuem os genes que codificam *hs409-417av*, *hs412-420av*, *hs413-421av*, *hs4014-422av*, *hs396-405av*, *hs404-412av*, e *hsGlnK C414H*, respectivamente. Nestes plasmídeos, as quimeras são expressas conjuntamente com *hsGlnK*, cada qual a partir de seu próprio promotor *T7/lacO*.

5.2.10. Construção dos plasmídeos codificando proteínas quiméricas e *hsGlnK* com a substituição G89A

Primeiramente, o plasmídeo pAASHsglnKG89A29 foi usado como DNA molde para uma PCR usando os *primers* T7F *grd* e pET28aKpn rev2 (K-B-S-S), gerando um produto de amplificação contendo a região promotora de pET29a, o gene *hs glnK* codificante para a mutação G89A, e um sítio *KpnI* na região 3'. Este produto de PCR foi purificado, digerido com *NdeI* e *KpnI*, e ligado a pETDuet1 digerido com as mesmas enzimas. As ligações foram transformadas em *E. coli* TOP10, e as colônias resistentes a ampicilina foram cultivadas em meio líquido para a extração de plasmídeos e confirmação da inserção do gene *hs glnK* G89A por restrição com *XbaI* e *KpnI*. A ausência de mutações indesejadas no inserto foi confirmada através de seqüenciamento com o *primer* T7term *grd*. O novo plasmídeo foi denominado pAAS1555, e expressa *hsGlnK* G89A a partir do segundo promotor *T7/lacO* de pETDuet1.

Em seguida, os plasmídeos pAAS1518, pAAS1519, pAAS1520, pAAS1521, pAAS1522, pAAS1523, e pAAS1524 foram digeridos com *XbaI* e *BamHI* e clonados em pAAS1555 digerido com as mesmas enzimas. Os clones foram selecionados por extração dos plasmídeos e confirmação do padrão de restrição com *XbaI* e *BamHI*. Estes novos

plasmídeos foram nomeados pAS1601, pAS1602, pAS1603, pAS1604, pAS1605, pAS1606, e pAS1607, e expressam, respectivamente, hs409-417av, hs412-420av, hs413-421av, hs4014-422av, hs396-405av, hs404-412av, e hsGlnK C414H em conjunto com hsGlnK G89A, cada qual a partir de seu próprio promotor *T7/lacO*.

5.2.11. Avaliação da atividade das quimeras de hsNifA e avNifA

A atividade de todas as quimeras e de hsNifA C414H foi avaliada na presença de hsGlnK, de hsGlnK G89A, e na ausência de domínio GAF através da ativação transcricional de uma fusão *nifH::lacZ* (presente no plasmídeo pRT22) e detecção da atividade de β -galactosidase decorrente. Células de *E. coli* JM109(λ DE3) contendo o plasmídeo-repórter pRT22 foram transformadas com os plasmídeos DN185, HsglnKDNifA, HsglnKG89ADNifA, pAAS1501, pAAS1502, pAAS1503, pAAS1504, pAAS1505, pAAS1506, pAAS1507, pAAS1609, pAAS1525, pAAS1526, pAAS1527, pAAS1528, pAAS1529, pAAS1530, pAAS1531, pAS1601, pAS1602, pAS1603, pAS1604, pAS1605, pAS1606, e pAS1607. Os transformantes foram cultivados na ausência de amônio e na presença ou ausência de oxigênio, conforme descrito na seção 4.5.4 (p. 82), para a realização dos ensaios de atividade enzimática. Os resultados são mostrados na tabela 11. Valores em **negrito** indicam níveis de atividade semelhantes às do controle positivo ($\Delta(1-185)$ NifA, hsGlnK + hsNifA, ou hsGlnK G89A + hsNifA conforme o experimento), e valores sublinhados indicam atividade inferior à do controle positivo, porém superior à do controle negativo. Cultivos denominados de “baixa expressão” foram realizados na presença de 5 μ M de IPTG no meio de cultura; cultivos em “alta expressão” possuíam 500 μ M de IPTG no meio de cultivo.

TABELA 11 – ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE DE CÉLULAS EXPRESSANDO AS QUIMERAS DE NifA

	Ausência do domínio GAF ¹				Presença de hsGlnK ²				Presença de hsGlnK G89A ³	
	Baixa expressão		Alta expressão		Baixa expressão		Alta Expressão		Alta expressão	
proteína	O+	O-	O+	O-	O+	O-	O+	O-	O+	O-
[controle negativo] ⁴	63,9	8,3	75,0	22,9	9,5	55,5	29,9	28,8	17,7	28,7
[controle positivo] ⁵	38,5	2235,0	79,9	228,6	7,3	3180,9	12,5	541,3	15,6	26,4
hs396-405av	659,6	881,8	994,1	637,3	0,0	52,5	23,5	22,0	29,4	33,9
hs404-412av	<u>114,1</u>	348,8	806,6	53,0	<u>58,7</u>	78,3	<u>125,3</u>	<u>90,2</u>	22,8	30,3
hs409-417av	520,7	931,7	970,3	102,0	422,8	1139,9	542,4	263,7	27,3	20,0
hs412-420av	<u>107,5</u>	362,7	914,0	73,0	42,8	132,0	301,9	181,4	20,5	20,9
hs413-421av	181,3	368,9	865,3	89,0	<u>80,5</u>	135,4	379,9	213,0	23,2	26,3
hs414-422av	31,8	<u>33,8</u>	358,3	<u>41,8</u>	<u>31,1</u>	45,9	26,5	1,5	25,3	32,7
hs434-442av	13,1	11,6	14,0	16,0	nd ⁶	nd ⁶	nd ⁶	nd ⁶	nd ⁶	nd ⁶
hsNifA C414H	71,5	<u>81,7</u>	516,4	<u>41,8</u>	<u>64,1</u>	83,0	35,3	0,0	26,7	26,4

¹O controle positivo consiste em *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 contendo o plasmídeo DN185 (expressa Δ(1-185)NifA).

²O controle positivo consiste em *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 contendo o plasmídeo HsglnKDNifA (expressa hsNifA e hsGlnK).

³O controle positivo consiste em *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 contendo o plasmídeo HsglnKG89ADNifA (expressa hsNifA e hsGlnK G89A).

⁴*E. coli* JM109(λDE3) pRT22 sem plasmídeos adicionais.

⁵Ver notas 1-2.

⁶Não determinado.

Como já sabido, hsNifA não é ativa na presença de oxigênio, independentemente da presença de PII, e não é ativa na presença de hsGlnK G89A mesmo na ausência de oxigênio. As proteínas quiméricas possuem, todas elas, diferenças em relação a esse fenótipo. Os resultados dos experimentos levaram às seguintes observações:

1. Na ausência do domínio regulatório GAF, hsNifA C414H e todas as proteínas quiméricas, exceto hs434-442av, apresentaram atividade na presença de oxigênio. Suas respectivas atividades não foram idênticas: hs396-405av, hs409-417av e hs413-421av mantiveram atividade detectável e relativamente elevada (30-50% da

atividade de $\Delta(1-185)$ hsNifA, quando aplicável) em todas as quatro condições testadas; hs404-412av e hs412-420av tiveram atividades mais baixas e com padrão mais errático, e hs414-422av e hsNifA C414H só foram ativas quando superexpressas.

2. Na presença do domínio GAF inibidor e da proteína hsGlnK, algumas proteínas antes ativas (hs396-405av, hs404-412av, hs414-422av, e hsNifA C414H) tornaram-se inativas. hs412-413av e hs413-421av só apresentaram atividade quando superexpressas. Apenas hs409-417av apresentou bons níveis de ativação da transcrição de *nifH::lacZ* (30-50% da atividade de $\Delta(1-185)$ hsNifA) em todas as condições.
3. Nenhuma proteína contendo o domínio GAF foi ativada quando coexpressa com hsGlnK G89A.

Os resultados mostram que algumas das construções descritas atendem a alguns dos critérios estabelecidos para a escolha de uma proteína para uso nos experimentos de mutagenese aleatória. Dentre as proteínas avaliadas, a proteína quimérica hs409-417av é a que melhor atende aos requisitos devido à sua insensibilidade a oxigênio, inibição por amônio intacta e dependência de hsGlnK para ativação, e atividade de ativação transcricional relativamente alta. Conseqüentemente, hs409-417av foi escolhida para dar seguimento à mutação do domínio GAF.

É interessante comentar o fenótipo de algumas das outras proteínas para tentar melhor entender a elusiva regulação por oxigênio de hsNifA. A única variante construída que não apresentou qualquer atividade foi hs434-442av – presumivelmente por problemas de estruturação, uma vez que não foi ativa nem mesmo na ausência de oxigênio; todas as restantes mostraram ao menos um pouco de atividade, e todas perderam a inibição por O₂.

A proteína hs414-422av possui a primeira cisteína do cluster de ferro-enxofre (e a segunda, que está presente em praticamente todas as proteínas NifA); embora pouco ativa, sua resistência a oxigênio foi claramente demonstrada. Isso indica que, na ausência das duas cisteínas terminais, as duas primeiras cisteínas não são suficientes por si mesmas de manter a sensibilidade a oxigênio. É possível que sua presença seja desfavorável à estruturação da região terminal do domínio AAA+ quando a outra metade do possível cluster de ferro-enxofre está ausente, o que possivelmente explicaria a baixa atividade observada.

A reconstituição do domínio GAF teve por efeito tornar permanentemente inativas as proteínas hs396-405av (que havia sido bastante ativa na ausência de GAF), hs404-412av, e hs414-420av – por alguma razão que não se pôde discernir essas são as proteínas cujos pontos de junção entre a sequência de hsNifA e avNifA mais distam do trecho de α -

hélice imediatamente a montante de C414 em hsNifA. A razão para isto não se pôde discernir.

Por fim, a introdução da mutação C414H em hsNifA gerou uma proteína cuja atividade baixa ainda assim pôde ser detectada na presença de oxigênio – em claro contraste com hsNifA C414S, que é totalmente inativa (OLIVEIRA *et al.*, 2009). O fato de que a substituição de uma única cisteína do (possível) cluster de Fe-S por um resíduo compatível com a estrutura local bastou para eliminar a sensibilidade a O₂ é difícil de conciliar com o modelo de regulação mais aceito, que supõe que a formação do cluster reduzido é necessária para conferir a estrutura correta à região C-terminal do domínio central (FISHER, 1994). Neste modelo, a oxidação do cluster seria responsável por destruir a estrutura terciária local, impedindo a atividade de NifA; neste caso, é de se estranhar que a troca de uma das cisteínas por histidina (o que presumivelmente impediria a formação correta do cluster) não apenas permite atividade em baixa oxigenação como permite-a em alta concentração de O₂. Aventa-se duas possíveis explicações para conciliar o modelo com o fenótipo de hsNifA C414H: (1) é possível que o resíduo de histidina não destrua o cluster, mas sim o estabilize, uma vez que resíduos de histidina comumente são capazes de interagir com metais (CHAKRABARTI, 1990), inclusive ferro (YAMAMOTO e CHUJOU, 1992); (2) é possível que o modo de ação do cluster de Fe-S envolva seqüestrar C414 para impedi-la de realizar alguma interação inibitória com resíduos do domínio central.

5.2.12. Construção de plasmídeos para a mutagênese aleatória de hs409-417av (introdução do sítio *Xho*I em hs409-417av)

Antes de realizar os experimentos de mutagênese aleatória do domínio GAF de NifA, foi necessário introduzir o sítio *Xho*I com mutações silenciosas entre as bases 570 e 574 (ver seção 5.2.4). Para isso, o plasmídeo nifAxho29 foi digerido com *Apal*; os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% , e o fragmento contendo a região promotora *T7/lacO* e a porção 5' do gene *hs nifA[xho]* foi extraído do gel e purificado. O plasmídeo pAAS1501 foi igualmente digerido com *Apal* e desfosfatizado com SAP. O fragmento extraído de R129 foi ligado à mistura de fragmentos da digestão de pAAS1501, e a ligação foi transformada em *E. coli* TOP10. Colônias resistentes a kanamicina tiveram seus plasmídeos selecionados por PCR de colônia com os *primers* T7Fgrd e T7term grd; clones positivos (contendo bandas de ~1700 pares de bases) foram cultivados em LB para extração dos plasmídeos e confirmação da identidade dos insertos por restrição com *Not*I (há um sítio na posição 1476 em *hs nifA*, mas não nas quimeras) e *Sal*I (há dois sítios nas quimeras, em 455 e 1346, mas apenas em em hsNifA, em 455). O plasmídeo com o padrão de restrição correto foi nomeado pAAS1613.

Em seguida, o plasmídeo pAAS1613 foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI, e o inserto contendo o gene *hs409-417av[xho]* foi transferido para *Dxho** e *Dxho**K digeridos com as mesmas enzimas, gerando os plasmídeos pAAS1615 e pAAS1614, respectivamente. A presença dos insertos corretos foi confirmada por PCR usando os *primers* T7F *grd* e DuetDOWN1.

5.2.13. Mutagênese aleatória de *hs409-417av*

De posse do gene quimérico *hs409-417av[xho]* devidamente clonado nos plasmídeos *Dxho** e *Dxho**K, procedeu-se com a mutagênese aleatória do domínio GAF de *hsNifA*. Para isso, o plasmídeo pAAS1613 foi usado como DNA molde para uma reação de PCR de baixa fidelidade empregando os *primers* T7F *grd* e T7term *grd* (ver seções 4.7.4 e 5.2.5). Para a obtenção de bibliotecas de mutantes contendo alterações no domínio GAF, o produto de PCR obtido foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Xho*I para ligação aos plasmídeos pAAS1614 e pAAS1615. Inicialmente três bibliotecas diferentes foram construídas, visando selecionar os dois fenótipos possíveis para os mutantes de *hsNifA*:

Biblioteca 1, busca de mutações inativadoras (perda de função): o fragmento contendo a região 5' de *hs409-417av[xho]* mutagenizada foi inserido entre os sítios *Xba*I e *Xho*I em pAAS1614 (que contém *hs409-417av[xho]* e *hs glnK* clonados em *Dxho**); a ligação foi transformada em *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 e plaqueada em LA contendo cloranfenicol, ampicilina, 5 μM de IPTG e Xgal. Devido à presença de ambos *hs409-417av[xho]* e *hsGlnK* no citoplasma, células contendo o gene *hs409-417av[xho]* selvagem ou com mutações irrelevantes apresentam cor azul; células expressando *hs409-417av[xho]* permanentemente inativa, irresponsível a *hsGlnK*, apresentam coloração branca. Estas colônias brancas foram selecionadas para extração de plasmídeos e posterior seqüenciamento com os *primers* pET upstream, N185-RAM, e DuetDOWN1.

Biblioteca 2, busca de mutações ativadoras (ganho de função): o fragmento contendo a região 5' de *hs409-417av[xho]* mutagenizada foi inserido entre os sítios *Xba*I e *Xho*I em pAAS1615 (que contém somente *hs409-417av[xho]* clonado em *Dxho**); a ligação foi transformada em *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 e plaqueada em LA contendo cloranfenicol, ampicilina, 5 μM de IPTG e Xgal. Devido à ausência de *hsGlnK* no citoplasma, células expressando *hs409-417av[xho]* selvagem ou com mutações irrelevantes apresentam cor branca; células contendo *hs409-417av[xho]* permanentemente ativada, que não necessita de *hsGlnK*, apresentam coloração azul. Estas colônias azuis foram selecionadas e seus plasmídeos foram seqüenciados com os *primers* pET upstream, N185-RAM, e DuetDOWN1.

Biblioteca 3, busca de mutações ativadoras (ganho de função): o fragmento contendo a região 3' de *hs409-417av* mutagenizada foi inserido com as enzimas *XhoI* e *HindIII* em pAAS1615 (que contém somente *hs409-417av[xhoI]* clonado em *Dxho**); a ligação foi transformada em *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 e plaqueada em LA contendo cloranfenicol, ampicilina, 5 µM de IPTG e Xgal. O fenótipo selecionado foi o mesmo da biblioteca 2; apenas a região mutagenizada foi diferente (resíduos 190-534, correspondentes aos domínios central e C-terminal da quimera).

Cerca de 5000 colônias de cada biblioteca foram triadas visualmente, e ao todo 70 colônias brancas da biblioteca 1, nove da biblioteca 2, e sete da biblioteca 3 foram selecionadas para extração plasmidial e seqüenciamento. Dos 70 plasmídeos da biblioteca 1 seqüenciados com o *primer* pET upstream, onze continham inserções/deleções que alteravam a fase de leitura, três não continham o domínio GAF, quatro continham mutações para códons de parada, dez não tiveram o domínio GAF completamente seqüenciado e não tiveram mutações detectadas, e dez não continham mutações no domínio GAF; as 32 colônias restantes continham 26 variantes distintas de *hs409-417av*. Os nove clones da biblioteca 2 corresponderam a 6 variantes distintas, e os sete clones da biblioteca 3 continham 5 mutações únicas diferentes. As mutações encontradas nos três experimentos são listadas e comentadas na tabela 12. Os resíduos foram localizados no alinhamento de NifA previamente descrito (seção 5.2.6).

TABELA 12 – MUTANTES ALEATÓRIOS DE *hs409-417av[xhoI]*

Mutação	Observações (alinhamento)	Outras observações
Biblioteca 1		
D7N, K130E	D7 pouco conservado	K130 disponível isoladamente em outro mutante.
L14P ³	Hidrofóbico na maioria das NifA	
V15A, V125A, A163V -		
E19G	Polar na maioria das NifA	
L41P	Conservado; L na maioria das NifA	
L41H, T169I	L41 conservado; L na maioria das NifA	L41P disponível isoladamente em outro mutante
S42P ²	Pouco conservado	
S42P, Q103R	S42P e Q103 pouco conservados	S42P disponível isoladamente em outro mutante

L45P	Conservado; L na maioria das NifA	
L61S	Pouco conservado	
L63Q	Hidrofóbico em NifA sensíveis a O ₂ ; Q em <i>A. vinelandii</i>	
E83K	Conservado na maioria das NifA	
K88E ¹	Pouco conservado	
E104G	Conservado; polar na maioria das NifA	
G126D	Pouco conservado	
P128L	Conservado em todas as NifA, exceto as de rizóbios (nas quais é alanina)	
I129T	Hidrofóbico em todas as NifA	
K130E	Conservado; E em <i>S. meliloti</i>	
L136P ¹	Hidrofóbico na maioria das NifA	
L139S	Pouco conservado	
V156A	Hidrofóbico em NifA sensíveis a O ₂ ; T em <i>A. vinelandii</i>	
R157H	Conservado na maioria das NifA	R157C encontrado em outro mutante
R157C	Conservado na maioria das NifA	R157H encontrado em outro mutante
L158P	Conservado na maioria das NifA	
L159P	Conservado na maioria das NifA	
N164D	Conservado na maioria das NifA	

Biblioteca 2

F124L, V162A	Resíduo Resíduo 124 geralmente hidrofóbico; resíduo 162 altamente conservado (V ou A)	
V176G ¹	Geralmente hidrofóbico	
Q182R, K187R	Ambos os resíduos pouco conservados	
Q184P ¹	Pouco conservado	
R188P	Pouco conservado; polar na maioria das NifA	
L190P	Pouco conservado	Também encontrado na biblioteca 3

Biblioteca 3

E185G	Pouco conservado	
L190P	Pouco conservado	Também encontrado na biblioteca 2
L190H ¹	Pouco conservado	
Q193P	Pouco conservado	
L194P	Pouco conservado	

¹Encontrado em dois clones diferentes.

²Encontrado em três clones diferentes.

³Encontrado em quatro clones diferentes.

Conforme esperado, encontrou-se um maior número e maior diversidade de mutações na biblioteca 1 (mutações inativadoras) do que nas duas outras bibliotecas. Dentre as 26 variantes distintas de hs409-417av[xhoI] avaliadas, doze contêm substituições envolvendo glicina e prolina; supõe-se que causem alterações na estrutura secundária do domínio GAF que poderiam explicar sua falta de resposta a hsGlnK. O restante inclui mudanças de carga, mudanças de polaridade e outras mutações cujas implicações mecânicas não podem ser determinadas apenas por comparação com o alinhamento.

Um número muito menor de variantes de hs409-417av[xhoI] foi encontrado nas bibliotecas 2 e 3 (mutações ativadoras), e a identidade de suas substituições também foi menos diversa. Dentre as 11 variantes distintas encontradas nas duas bibliotecas somadas, seis contêm substituições de resíduos por glicina e duas por prolina – indicando que este tipo de mutação danosa à estrutura secundária local é predominante entre as mutações ativadoras de hs409-417av. Dez das 11 substituições ocorrem numa estreita faixa (resíduos 176-194) entre o final do domínio GAF e o Q-linker de hsNifA, o que sugere uma importância funcional dessa região para o alívio da inibição do domínio GAF sobre o domínio AAA+ central.

Um padrão de distinto de distribuição é claramente visível quanto à localização das substituições ativadoras e inativadoras: mutações inativadoras (biblioteca 1) estão presentes por todo o domínio GAF entre os resíduos 14 e 164 (D7N e T169I aparecem em conjunto com outras substituições para as quais se tem mutantes individuais), ao passo que as mutações ativadoras (bibliotecas 2 e 3) localizam-se quase exclusivamente entre os resíduos 176 e 194 (à exceção do mutante duplo F124L V162A). Estes dados sugerem que é possível distinguir duas regiões funcionalmente diferentes no domínio GAF de hsNifA: uma região N-terminal (resíduos 1-164), cuja mutagênese conduz a permanente inativação de hsNifA pelo domínio GAF, e uma região C-terminal (resíduos 176-194), cuja mutagênese conduz à perda da inibição pelo domínio GAF.

É concebível que a região N-terminal (1-164) seja o local de recepção/transmissão do sinal de ausência de amônio através da interação com PII; a substituição de resíduos ali localizados poderia levar à perda da capacidade de interagir com PII (levando à permanente inibição de hsNifA) ou à incapacidade de responder à interação com PII com as alterações conformacionais necessárias (também levando à permanente inativação de hsNifA). A região C-terminal (176-194), por sua vez, parece ser uma região essencial para causar a inibição de GAF sobre o restante da proteína hsNifA; a introdução de mutações nessa região (especialmente mutações que perturbem a estrutura secundária local) levaria à perda da estruturação necessária para inibir hsNifA, gerando proteínas ativas independentemente da presença de PII.

5.2.14. Localização das substituições de hs409-417av[xhol] em um modelo estrutural do domínio GAF

As substituições identificadas nos experimentos de mutagênese aleatória foram localizadas em modelos estruturais do domínio GAF de hsNifA. Não há estrutura cristalográfica de hsNifA nem de nenhuma proteína NifA inteira, e o único domínio GAF de um ativador de σ^{54} semelhante a NifA a ter sido cristalizado (BATCHELOR *et al.*, 2013) pertence a uma proteína de *A. aeolicus* cuja sequência apresenta alguma divergência com as demais proteínas NifA (ver árvore filogenética do alinhamento de 56 NifA construída por *neighbor joining*, apêndice 2). Portanto, é compreensível que a modelagem estrutural do domínio GAF não seja precisa, e que não haja um único modelo que cubra toda a extensão (resíduos 1-200) que se pretende analisar.

Os resíduos de 1-300 de hsNifA foram usados como sequência alvo para a busca por proteínas com sequência de aminoácidos e estrutura secundária semelhantes no banco de dados PDB, utilizando a ferramenta SWISS-MODEL (BIASINI *et al.*, 2014). Três modelos estruturais do domínio GAF de hsNifA foram construídos pelo SWISS-MODEL, baseados nas proteínas Nih1 de *A. aeolicus* (PDB 4G3K – BATCHELOR *et al.*, 2013), NtrC1 de *A. aeolicus* (PDB 4L4U – VIDANGOS *et al.*, 2013), e domínio GAF do bacteriofitocromo de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 3NHQ – YANG *et al.*, 2011). As principais características destes modelos estão na tabela abaixo:

TABELA 13 – INFORMAÇÕES DOS MODELOS ESTRUTURAIS CONSTRUÍDOS PARA GAF DE HsNifA

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Template	Nlh1 de <i>A. aeolicus</i>	NtrC1 de <i>A. aeolicus</i>	Bacteriofitocromo de <i>P. aeruginosa</i>
PDB no.	4G3K	4L4U	3NHQ
Cobertura	10-179 (55%)	50-300 (77%)	11-261 (81%)
Similaridade de sequência ¹	0,37	0,33	0,25
QMEAN ²	-3,98 (razoável)	-7,01 (baixo)	-5,02 (baixo)

¹Calculada como a soma dos *scores* de substituição dividido pelo número de resíduos alinhados (excluindo os gaps), usando a matriz BLOSUM62 (HENIKOFF e HENIKOFF, 1992)

²Estimativa de qualidade do modelo construído (BENKERT *et al.*, 2011)

Nenhum dos modelos possui alta qualidade e nenhum é capaz de modelar os primeiros 9 resíduos com precisão. O modelo 1, baseado em Nlh1 de *A. aeolicus*, é decididamente o melhor, porém infelizmente não inclui a maioria dos resíduos mutagenizados nas bibliotecas 2 e 3 (foi justamente essa limitação que levou ao uso dos outros dois modelos estruturais, a despeito de sua menor qualidade). Um alinhamento entre HsNifA e as três proteínas usadas como modelo deixa claras as limitações das seqüências disponíveis:

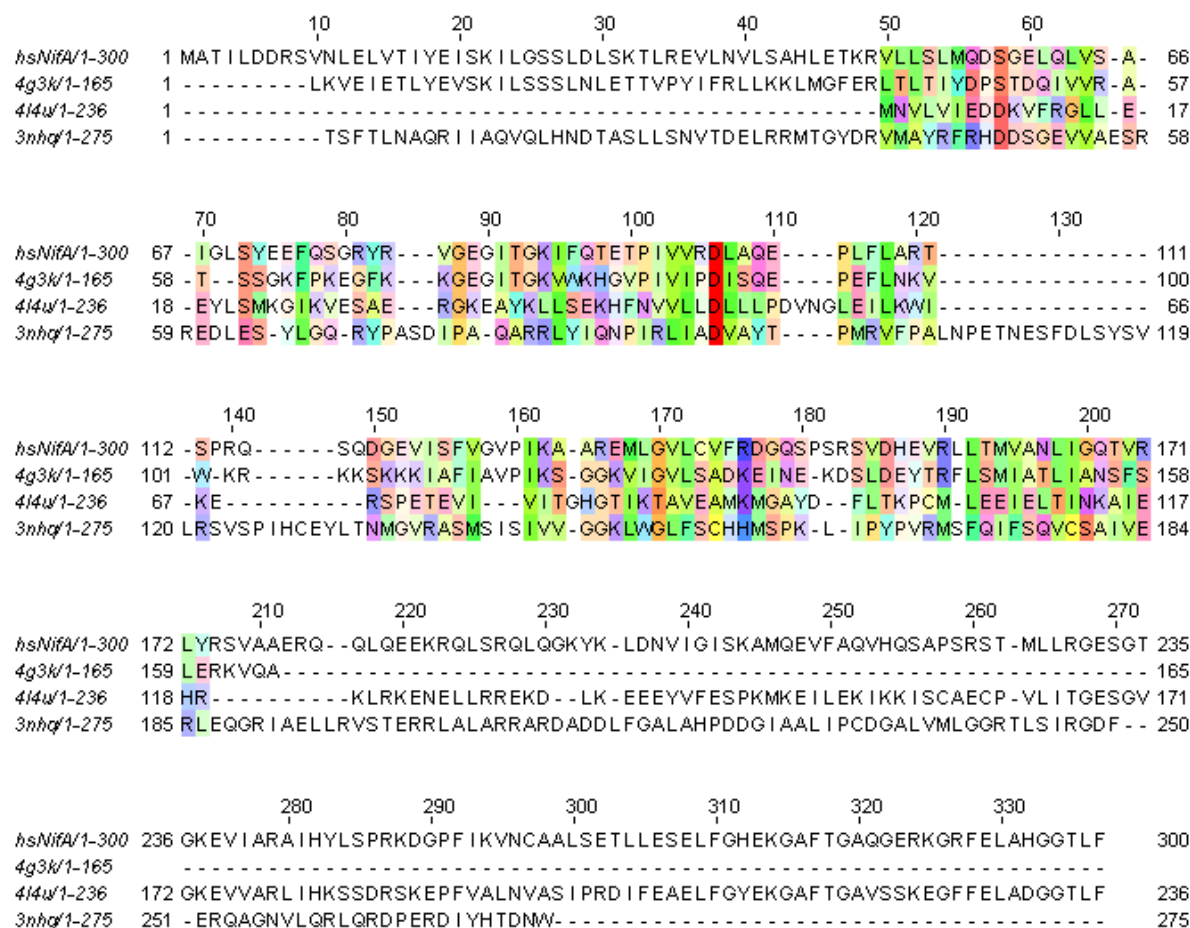


Figura 26 - Alinhamento de dos primeiros 300 resíduos de hsNifA com os resíduos presentes nas estruturas 4G3K, 4L4U, e 3NHQ.

As três estruturas foram usadas separadamente como template para a produção de modelos estruturais do domínio GAF de hsNifA. A imagem foi gerada no programa Jalview 2.10 (coloração Taylor, *conservation threshold* 20%).

Apesar das limitações, os três modelos concordam em alguns pontos essenciais: os três conseguem modelar o domínio GAF de hsNifA na forma dimérica; os modelos 1 e 3 capturam bem o motivo GAF, com seu núcleo de folha β flanqueado por segmentos curtos de α -hélice; e os modelos 2 e 3 reconhecem um longo trecho de α -hélice a partir dos resíduos 151 (modelos 1 e 3) ou 159 (modelo 2) até em torno do resíduo 200, com algumas perturbações. Esta região é a hélice conectora que une o domínio GAF propriamente dito ao domínio AAA+, e parece ser importante para a regulação de Nih1 de *A. aeolicus* (BATCHELOR *et al.*, 2013), o molde do modelo 1. A localização das substituições identificadas nos experimentos de mutagênese aleatória é mostrada nos três modelos estruturais na figura 27.

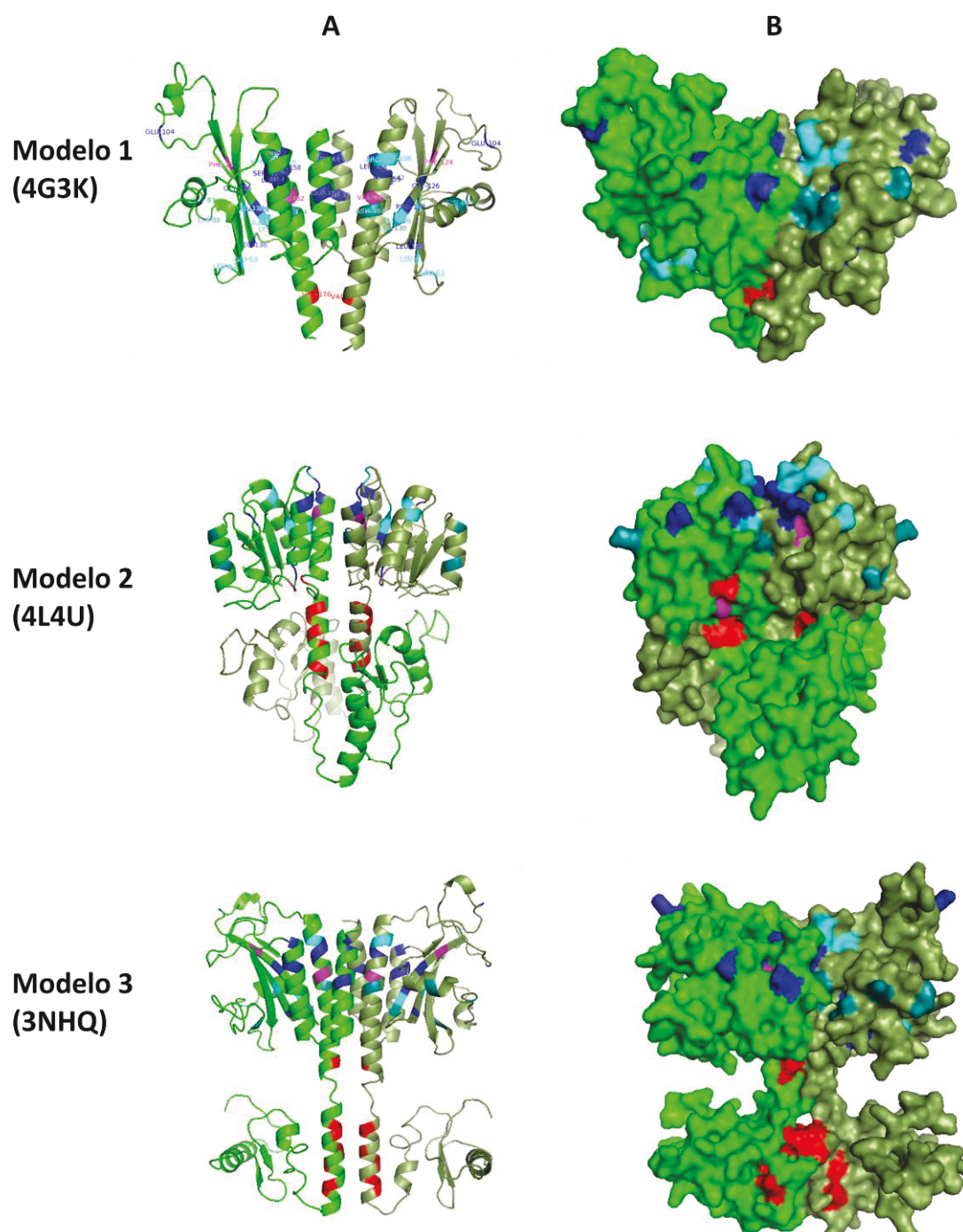


Figura 27 - Localização dos resíduos de aminoácidos substituídos durante o experimento de mutagênese aleatória em três modelos estruturais do domínio GAF de hsNifA.

Para uma descrição dos três modelos, ver texto e tabela 12. Nas posições marcadas em tons de azul, foram encontradas mutações inativadoras (biblioteca 1); naquelas marcadas em vermelho ou magenta, substituições ativadoras (bibliotecas 2 e 3). **Azul escuro**, mutações inativadoras envolvendo prolina ou glicina; **azul petróleo**, mutações inativadoras que geram troca de carga; **ciano**, demais mutações inativadoras; **vermelho**, mutações ativadoras envolvendo prolina ou glicina; **magenta**, os dois resíduos mutagenizados no duplo mutante F124L, V162A. Os três modelos estão mostrados tanto como modelo de estrutura secundária (A, imagens à esquerda), quanto como modelo de superfície (B, imagens à direita).

A separação espacial entre as mutações inativadoras e ativadoras torna-se ainda mais visível quando apresentada desta forma. As mutações inativadoras distribuem-se por todo o segmento N-terminal do domínio GAF. Diferentemente do que se observou com as mutações de hsGlnK (ver seção 5.1.9), não foi possível identificar uma superfície específica do domínio GAF que concentrasse a maioria das mutações; as substituições ocorrem por todo o domínio GAF propriamente dito, em todo tipo de estrutura secundária, em resíduos expostos e resíduos enterrados, em resíduos próximos e distantes da hélice conectora.

Trabalhando apenas com o modelo 1, que possui maior homologia com hsNifA, localizou-se os resíduos mutagenizados encontram-se nos diferentes ambientes do domínio GAF; um resumo do que foi observado está na tabela 14. É difícil propor uma explicação para o fenótipo de cada mutação; supõe-se que os resíduos enterrados inativem hsNifA por impedir a transmissão do sinal de interação com PII, e que se algum dos resíduos mutagenizados estiver diretamente envolvido na interação com hsGlnK, este deve ser um dos resíduos mais expostos na superfície. Dentre estes, pareceram mais promissores os resíduos 19, 130, 157, e 164, que estão totalmente expostos na superfície com suas cadeias laterais voltadas para a mesma face. Os resíduos 61 e 88 também estão expostos com suas cadeias laterais voltadas para o solvente, embora cada um aponte numa direção diferente dos quatro resíduos anteriormente mencionados.

TABELA 14 – POSIÇÃO DAS MUTAÇÕES INATIVADORAS DE hs409-417av[xhoI] NO MODELO 1

Posição	Mutações encontradas	Comentário estrutural
14	L14P ⁴	Parcialmente exposto; cadeia lateral voltada para a interface dimérica
19	E19G	Exposto, cadeia lateral voltada para o exterior
41	L41P, L41H	Enterrado, cadeia lateral voltada para a hélice conectora
42	S42P ³	Exposto na superfície, cadeia lateral voltada para o interior do GAF
45	L45P	Parcialmente exposto, cadeia lateral voltada para a hélice conectora ¹
61	L61S	Exposto em um loop, cadeia lateral voltada para o exterior
63	L63Q	Exposto em folha β , próximo do resíduo 61, cadeia lateral voltada para a hélice conectora
83	E83K	Exposto em um loop, cadeia lateral voltada para o interior do GAF
88	K88E ²	Exposto em α -hélice, cadeia lateral voltada para o exterior
104	E104G	Exposto em um loop, cadeia lateral voltada para o

		interior do GAF
126	G126D	Enterrado, em folha β
128	P128L	Pouco exposto, em folha β , cadeia lateral voltada para o interior do GAF
129	I129T	Enterrado, cadeia lateral apontando para o interior do GAF
130	K130E	Exposto, em folha β , cadeia lateral voltada para o exterior
136	L136P ²	Pouco exposto, cadeia lateral voltada para a hélice conectora
139	L139S	Enterrado, cadeia lateral voltada para a hélice conectora
156	V156A	Exposto na hélice conectora, cadeia lateral voltada para o interior do GAF
157	R157H, R157C	Exposto na hélice conectora, cadeia lateral voltada para o exterior, na mesma direção de 130
158	L158P	Pouco exposto na hélice conectora, cadeia lateral voltada para I17
159	L159P	Enterrado, na hélice conectora, cadeia lateral voltada para o interior do GAF
164	N164D	Exposto na hélice conectora, cadeia lateral voltada para o exterior, na mesma direção de 130 e 157

¹Hélice conectora é a região que inicia-se no resíduo 151 de hsNifA e segue até o resíduo 194-195. O modelo 1 contém somente a região entre 151-179 da hélice conectora.

²Encontrado em dois clones diferentes.

³Encontrado em três clones diferentes.

⁴Encontrado em quatro clones diferentes.

Apenas duas das variantes ativadoras (V176G e o duplo mutante F124L V162A) mutações ativadoras puderam ser localizadas no modelo estrutural 1, baseado em Nih1 de *A. aeolicus* 4G3K, devido à ausência de resíduos na estrutura da proteína cristalizada após o resíduo 179; as demais mutações ativadoras podem ser vistas nos outros dois modelos, nos quais fica evidente que estão localizadas em uma grande hélice que conecta os domínios GAF e AAA+ de hsNifA. Nenhum dos modelos construídos mostra uma hélice perfeitamente contínua conectando os domínios GAF e AAA+, mas isso provavelmente se deve às limitações do alinhamento de hsNifA ao molde: o modelo 2 assume uma quebra de continuidade da hélice entre os resíduos 171-182 de hsNifA (205-218 do alinhamento), uma região para a qual não há resíduos em NtrC1 de *A. aeolicus* homólogos aos de hsNifA; e o modelo 3 prevê uma falha na α -hélice entre os resíduos 178-182 de hsNifA (212-218 do alinhamento), uma região em que o domínio GAF do bacteriofitocromo de *P. aeruginosa* possui uma inserção de dois resíduos em relação a hsNifA (figura 26). Os modelos de predição de estrutura secundária foram unânicos em atribuir a no mínimo a região entre os

resíduos 168-193 de hsNifA a presença de uma α -hélice contínua (figura 28). Na parte C-terminal desta hélice localizam-se a quase todas as mutações ativadoras de NifA identificadas.

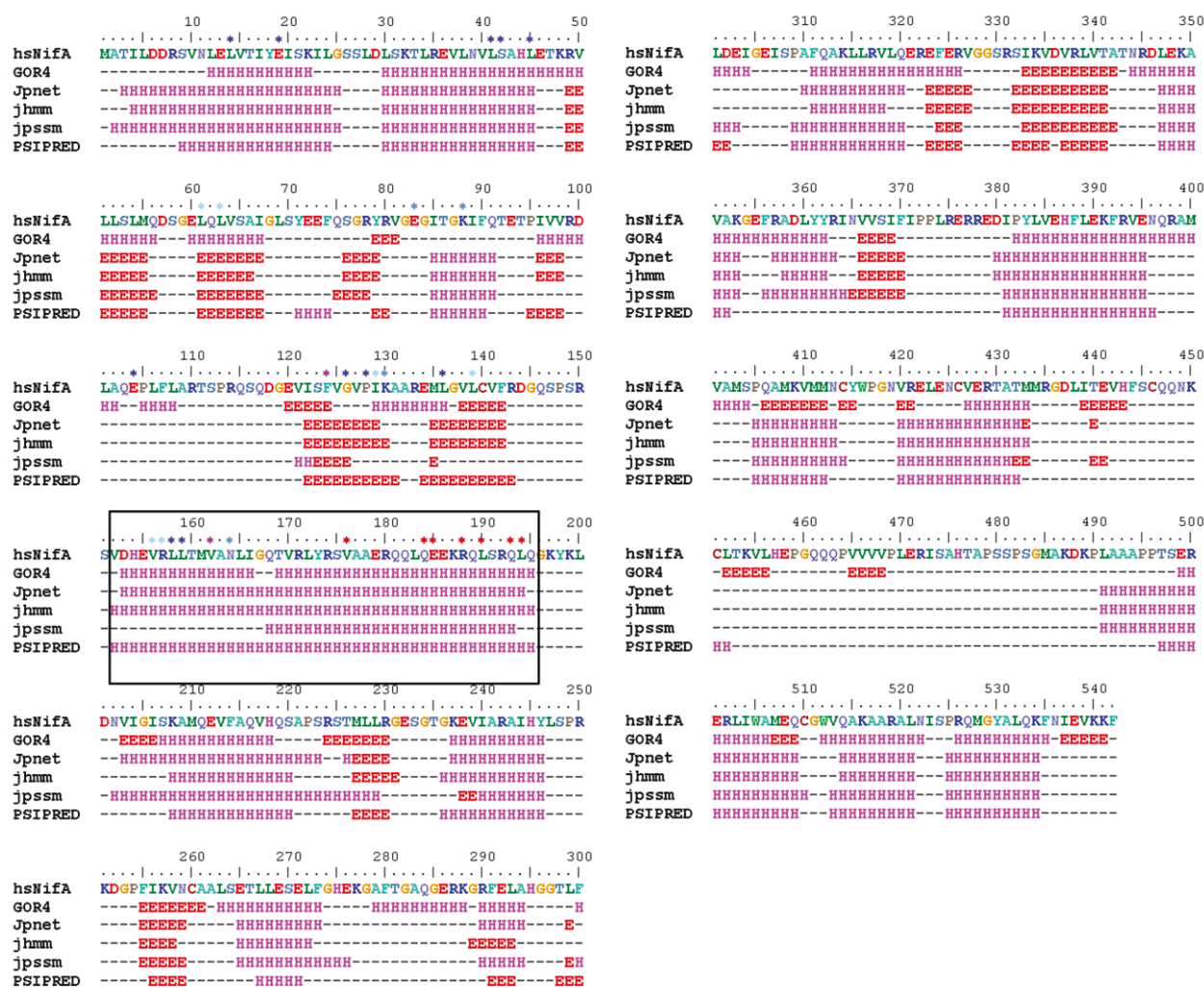


Figura 28 - Predição de estrutura secundária de hsNifA realizada com as ferramentas GOR4, Jpred, e PSIPRED.

Os resíduos de HsNifA para os quais encontrou-se mutantes nas bibliotecas de mutagenese aleatória estão **marcados com asteriscos (*)** com o mesmo código de cores empregado na figura 27: **azul escuro**, mutações inativadoras envolvendo prolina ou glicina; **azul petróleo**, mutações inativadoras que geram troca de carga; **ciano**, demais mutações inativadoras; **vermelho**, mutações ativadoras envolvendo prolina ou glicina; **magenta**, os dois resíduos mutagenizados no duplo mutante F124L, V162A. Nas linhas representando a estrutura secundária de hsNifA, **-H** indica α -hélice, **-E** indica folha β , e **-** indica qualquer outro tipo de estrutura. A região entre os resíduos 152-194 de hsNifA, correspondente a uma α -hélice contínua que conecta os domínios GAF e AAA+, está evidenciada por um retângulo em preto. A figura foi gerada com o programa BioEdit. GOR4, Jpnet, jhmm, jpssm, e PSIPRED referem-se aos resultados de cálculo de estrutura secundária obtidos com o uso de diferentes programas (ver seção 4.6.5, p. 87).

5.2.15. Discussão: modelo de regulação de hs409-417av[xhol], inibição *in trans* ou *in cis*

Os primeiros estudos com a proteína hsNifA sugeriram que a inibição do domínio AAA+ pelo domínio GAF ocorreria devido a interações intramoleculares entre resíduos dos dois domínios. Resíduos presentes no domínio GAF interagiriam com outros resíduos no domínio Central, impedindo a oligomerização correta, ou clivagem de ATP, ou interação com σ^{54} ; a interação com PII levaria a uma mudança de conformação que afastaria os resíduos inibitórios do domínio GAF de seus alvos no domínio central, permitindo a oligomerização/clivagem de ATP / interação com σ^{54} . Três evidências favoreceram esta hipótese: primeiro, o domínio GAF (resíduos 1-203) de hsNifA inibe a atividade de $\Delta(1-203)$ NifA quando ambos são coexpressos em *E. coli* (MONTEIRO *et al.*, 1999b); segundo, o domínio GAF (1-203) purificado inibe a atividade ATPásica de $\Delta(1-203)$ NifA purificada (MONTEIRO *et al.*, 2001); e terceiro, uma substituição G25E no domínio GAF gera uma proteína variante de hsNifA parcialmente ativa na ausência de coexpressão de PII (AQUINO *et al.*, 2015). A possibilidade de hsNifA ser regulada desta maneira também foi reforçada pela caracterização da proteína NorR de *E. coli*, um ativador transcricional que possui a mesma organização modular que as proteínas NifA; em NorR, experimentos de mutagênese aleatória dos domínios GAF e AAA+ localizaram resíduos em ambos os domínios cuja substituição conduzia à perda de inibição da atividade (BUSH *et al.*, 2010). O domínio GAF liga-se especificamente à região do motivo GAFTGA do domínio AAA+, que interage com σ^{54} – a prevenção da interação de com NorR com σ^{54} parece ser o modo como GAF inibe NorR (o estado de oligomerização de NorR é controlado independentemente pela interação com DNA – TUCKER *et al.*, 2010).

Um segundo modelo para a regulação de hsNifA tornou-se possível a partir da cristalização do domínio GAF de NifH de *A. aeolicus*, outro ativador transcricional com a mesma arquitetura de NifA (e que, embora divergente, possui maior homologia com o domínio GAF das proteínas NifA do que qualquer outra proteína já cristalizada), foi cristalizado na presença e na ausência de um ligante (BATCHELOR *et al.*, 2013). Com base nos dados estruturais, os autores propuseram um mecanismo de regulação no qual o domínio GAF de NifH inibe a proteína ao controlar seu estado de oligomerização: o domínio GAF é dimérico, e mantém os domínios AAA+ na conformação dimérica inativa através da longa hélice que conecta os dois domínios; a detecção do sinal de ativação (no caso, a interação com um ligante) leva a alterações conformacionais no domínio GAF que destroem a estrutura secundária da hélice conectora, permitindo aos domínios AAA+ associar-se formando o hexâmero ativo.

A despeito das dificuldades encontradas na interpretação dos dados de mutagênese aleatória do domínio GAF, os resultados definitivamente favorecem a hipótese

de que a inibição de hsNifA por GAF seguiria o mecanismo de controle de oligomerização, e não de regulação por interações inibitórias intramoleculares. Seis razões apóiam esta possibilidade:

1. As mutações ativadoras e inativadoras encontradas em hsNifA encontram-se em regiões bastante distintas do domínio GAF. Caso a interação resíduo-resíduo fosse a principal responsável pela inibição interdomínio, seria esperado encontrar mutações ativadoras por todo o domínio GAF (já que qualquer desestruturação poderia levar ao posicionamento incorreto dos resíduos necessários para a interação), em especial na face do domínio responsável pela interação com AAA+; tal não se observou nos experimentos descritos aqui. Em vez disso, as mutações ativadoras individuais concentram-se todas na porção C-terminal do domínio GAF, justamente na hélice de conexão com o domínio AAA+.
2. Não se encontrou mutações ativadoras no domínio central. Novamente, se a causa da inibição de AAA+ por GAF fosse a interação entre resíduos dos dois domínios, seria esperado encontrar mutantes no domínio AAA+ que fossem ativos na presença do GAF na biblioteca 3. Isto não ocorreu: todos os mutantes encontrados na biblioteca 3 restringem-se à região da hélice conectora.
3. A maior parte das mutações ativadoras identificadas constitui-se da substituição de resíduos da hélice conectora por glicina, um resíduo freqüentemente terminador de α -hélice (AURORA, SRINIVASAN, e ROSE, 1994), ou prolina, que costuma ser prejudicial à manutenção de α -hélice.
4. As mutações inativadoras de hsNifA localizam-se por todo o domínio GAF, inclusive na região da hélice conectora que pode interagir com outros resíduos do mesmo domínio; nenhuma ocorre na porção da hélice que não interage com o restante do GAF.
5. O domínio GAF (1-185) isolado de hsNifA é dimérico em solução, diferentemente da proteína $\Delta(1-185)$ NifA, que é monomérica (STEFANELLO, 2014). Isto sugere que o domínio GAF é o principal responsável por manter o estado de oligomerização de NifA na forma dimérica.

Os trabalhos anteriores apresentam algumas dificuldades para o modelo de regulação de hsNifA por controle do estado de oligomerização mediado por GAF, mas é possível saná-las com algumas observações.

Primeiramente, Monteiro e colaboradores (1999b) definitivamente observaram uma queda na atividade de $\Delta(1-203)$ NifA quando GAF (1-203) foi coexpresso em células de *E. coli*, e a queda da atividade não pode ser explicada por diferenças de expressão (ver figura 2 em MONTEIRO *et al.*, 1999b). É importante notar, porém, que o domínio GAF utilizado naqueles experimentos contém também toda a hélice conectora e todo o restante do Q-

linker; nos modelos de hsNifA construídos com base nas estruturas 4U4L e 3NHQ, os resíduos 187-203 já estão enterrados no domínio AAA+ (figura 27), e é bem possível que haja interações diretas entre estes resíduos e os adjacentes no domínio central. Neste caso, explica-se o observado nos experimentos de Monteiro e colaboradores em 1999 como sendo um ancoramento do domínio GAF por interações entre o final da hélice conectora e o domínio AAA+, seguida de manutenção da proteína reconstituída no estado dimérico inativo. Isto é reforçado pela observação de que a inibição *in trans* de $\Delta(1-203)$ NifA não ocorre com a coexpressão dos resíduos 1-185 do domínio GAF (dados não publicados). Os resultados de Monteiro e colaboradores (2001) com versões purificadas do domínio GAF (1-203) e de $\Delta(1-203)$ NifA podem ser explicados da mesma maneira.

Em segundo lugar, há a substituição G25E de hsNifA que gerou um mutante com atividade na ausência de PII. Quando localizado no modelo 1 (baseado em Nlh1 de *A. aeolicus*), o resíduo G25 aparece enterrado na interface entre os dois monômeros de GAF, com sua pequena cadeia lateral voltada para a face de dimerização (figura 29). É bastante possível que a substituição deste resíduo por glutamato, com uma cadeia maior e carregada negativamente, prejudique a dimerização de GAF, e por isso prejudique a inibição exercida por GAF sobre o domínio AAA+.

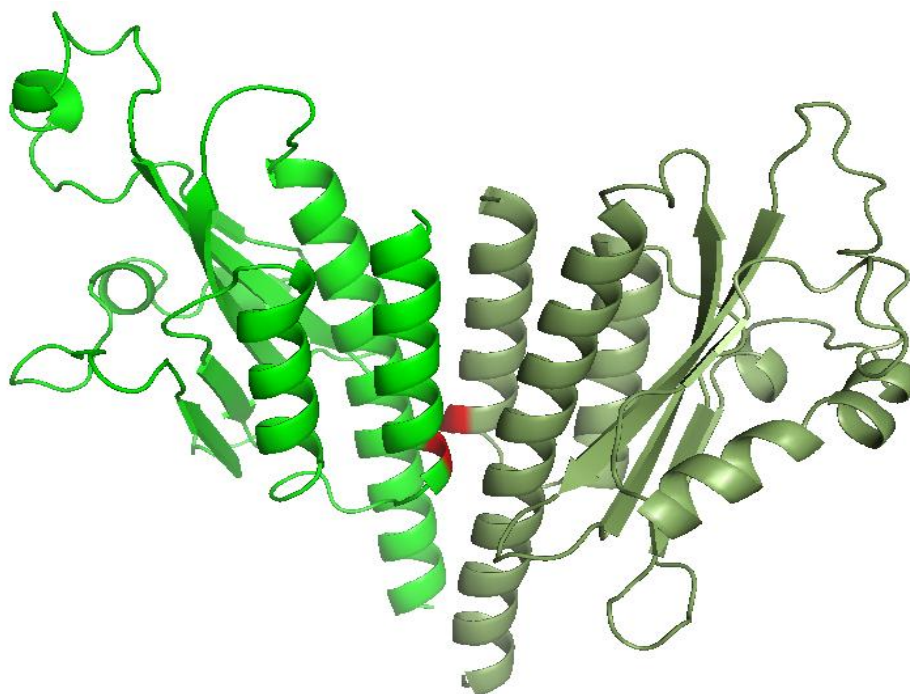


Figura 29 - Localização de G25 no modelo estrutural 1 de GAF de hsNifA (baseado na estrutura 4G3K).

Em vista disto, este trabalho endorsa o mecanismo de controle do estado de oligomerização como hipótese mais provável para explicar a inibição de hsNifA por seu domínio GAF.

A localização espacialmente separada das mutações inativadoras e ativadoras no domínio GAF também é bastante coerente com a atividade de variantes N-truncadas de hsNifA (STEFANELLO, 2011). A deleção dos primeiros 45, 90, e 135 resíduos de hsNifA gera proteínas completamente inativas sob todas as condições testadas, ao passo que a remoção dos primeiros 165 e 185 resíduos leva à atividade de hsNifA em *E. coli* sem regulação por amônio. No entanto, é preciso lembrar que ao menos uma variante inativadora, L172R (AQUINO *et al.*, 2015) foi encontrada na região entre 165-185. A conciliação destes dados implica em assumir que a região entre 165-172 (no máximo, 165 e 175) está envolvida na dimerização inibitória de GAF, porém não é por si mesma capaz de inibir totalmente a atividade de NifA se o restante do domínio GAF tiver sido removido.

A identidade das mutações encontradas no domínio GAF não é muito semelhante à das mutações ativadoras encontradas em NifA de *A. brasilense* e *R. rubrum*. O resíduo M173 de NifA de *R. rubrum* (rrNifA), que ao mesmo tempo aumenta a interação de rrNifA com GlnB e torna a proteína ativa na ausência de GlnB, é equivalente ao resíduo M161 de hsNifA. A substituição M161V é inativadora em hsNifA (AQUINO *et al.*, 2015). A substituição neste resíduo não foi encontrada de novo na biblioteca 1, mas ele está claramente localizado dentro da região em que se encontram mutações inativadoras em hsNifA. O fenótipo de mutantes contendo substituições próximas (R157H, R157C, L158P, L159P, N164D) também é inativador. Os resíduos de hsNifA equivalentes aos três resíduos de tirosina de *A. brasilense* cuja substituição gera variantes ativas GlnB-independentes em abNifA (18, 43, e 53 – CHEN *et al.*, 2005) são Y18, A43, e S54 (somente o primeiro destes resíduos é moderadamente conservado, sendo Y na maioria das NifA independentes de NifL, porém F em rizóbios, C em *Rhodobacter*, e H em *Gluconacetobacter*). Nenhum destes resíduos foi substituído em nenhuma das três bibliotecas, porém a alteração de resíduos próximos (19 e 42) causou inativação de hsNifA.

As mutações ativadoras encontradas nas bibliotecas 2 e 3 assemelham-se às que foram selecionadas em NifA de *R. palustris* (rpNifA), na qual substituições no interdomínio Q tornaram a proteína ativa e não regulada por amônio (REY *et al.*, 2007). O Q-linker é uma região de baixa homologia no alinhamento das proteínas NifA, dificultando a identificação precisa das posições equivalentes; tentativamente, os resíduos M202, Q209, L212, S213 de rpNifA foram identificados com os resíduos Q184, S191, L194, e Q195, respectivamente. A identificação de M202 e L212 de rpNifA com E185 e L194 de hsNifA parece ser confiável, a se observar a similaridade dos resíduos mais próximos (figura 30). Mesmo que a identificação de equivalência dos resíduos não seja perfeita, a identificação regional com o Q-linker é bastante evidente. A partir disto, sugere-se que a regulação de hsNifA por GAF assemelha-se mais à observada em *R. palustris* do que em *A. brasilense* e *R. rubrum*.

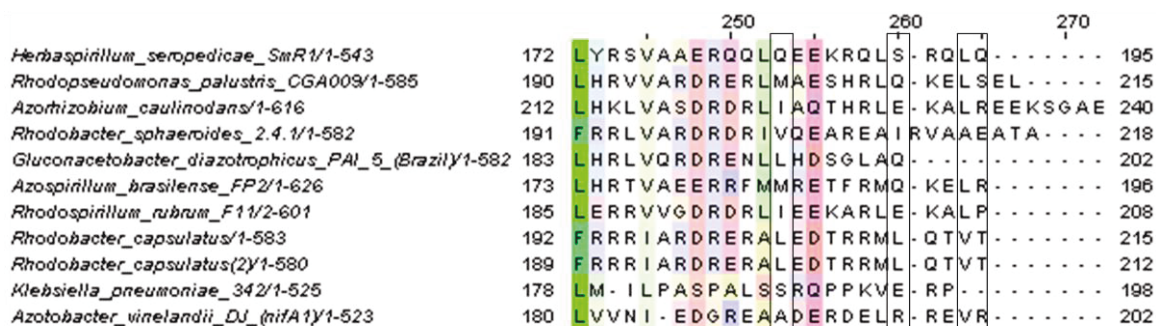


Figura 30 - Alinhamento de NifAs mostrando um trecho Q-linker.

Os resíduos mostrados equivalem a 172-195 de hsNifA. As posições dos resíduos 202, 209, 212, e 213 de rpNifA estão emoldurados. Proteínas NifA de onze organismos são mostradas para comparação. Figura gerada com o programa Jalview 2.10 (coloração Taylor, *conservation threshold* 20%).

5.2.16. Construção de plasmídeos para superexpressão de his-hs409-417av

Para adicionar uma cauda de histidinas N-terminal a hs409-417av, o plasmídeo pAAS1613 foi digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Os produtos da reação foram submetidos a eletroforese, e o fragmento contendo o gene *hs409-417av[xhoI]* foi extraído do gel e purificado. Este fragmento foi ligado a pET28a cortado com as mesmas enzimas, e a ligação foi transformada em *E. coli* TOP10. Colônias resistentes a kanamicina tiveram seus plasmídeos selecionados por PCR de colônia com os *primers* T7Fgrd e T7term grd; clones positivos foram cultivados em LB para extração dos plasmídeos e confirmação da identidade dos insertos por restrição com *NcoI* (há um três sítios para esta enzima em *hs409-417av[xhoI]*, localizados nas posições 480, 883, e 1197 – mas esta enzima não ocorre em pET29a, e está presente à montante do sítio de clonagem em pET28a) e seqüenciamento com o *primer* T7F. O novo plasmídeo, que codifica a quimera hs409-417av[xhoI] com uma cauda de histidinas N-terminal (his-hs409-417av[xhoI]), foi denominado pAAS1632.

O plasmídeo pAAS1632 foi digerido com as enzimas *XbaI* e *BamHI* e ligado ao plasmídeo Dxho*K cortado com as mesmas enzimas; a ligação foi transformada em *E. coli* TOP10, e os clones selecionados por PCR com os *primers* T7F grd e DuetDOWN1. O novo plasmídeo, que expressa his-hs409-417av[xhoI] e hsGlnK em *E. coli* a partir de promotores *T7/lacO* independentes, foi denominado pAAS1637. Verificou-se que a atividade de β -galactosidase gerada por este plasmídeo em *E. coli* JM109(λ DE3)pRT22 em nada diferia da de pAAS16614, que expressa hs409-417av[xhoI] sem a cauda de histidinas (dados não mostrados).

5.2.17. Testes de expressão e solubilidade

Visando explorar viabilidade de usar a quimera his-hs409-417av[xhoI] para experimentos de caracterização *in vitro*, procurou-se avaliar inicialmente sua expressão em *E. coli* e solubilidade em diferentes tampões. Para a realização do experimento com os controles necessários, células de *E. coli* JM109(λ DE3)pRT22 foram transformadas com os plasmídeos pEMB200, pETN185, DNifA, HsglnKDNifA, pAAS1632, e pAAS1637, que codificam para hsGlnK, $\Delta(1-185)$ hsNifA, hsNifA, hsNifA + hsGlnK, his-hs409-417av[xhoI], e his-hs409-417av[xhoI] + hsGlnK.

Num primeiro ensaio de expressão, células contendo os plasmídeos listados foram cultivadas em 5 mL de meio LB com os antibióticos apropriados por cerca de 3 horas a 37°C e 180 rpm até $DO_{600nm} \sim 0,6$, momento em que se adicionou 100 μ M de IPTG às culturas para permitir a expressão das proteínas pelas 3 horas subseqüentes a 30°C (ver seção 4.5.6, p. 83). As culturas foram então submetidas a centrifugação e as células foram ressuspendidas em 400 μ L de tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl) e lisadas por sonicação. Os extratos obtidos foram centrifugados para a separação da fração solúvel; ambos, extrato e fração solúvel, foram analisados por SDS-PAGE, conforme mostrado na figura abaixo:

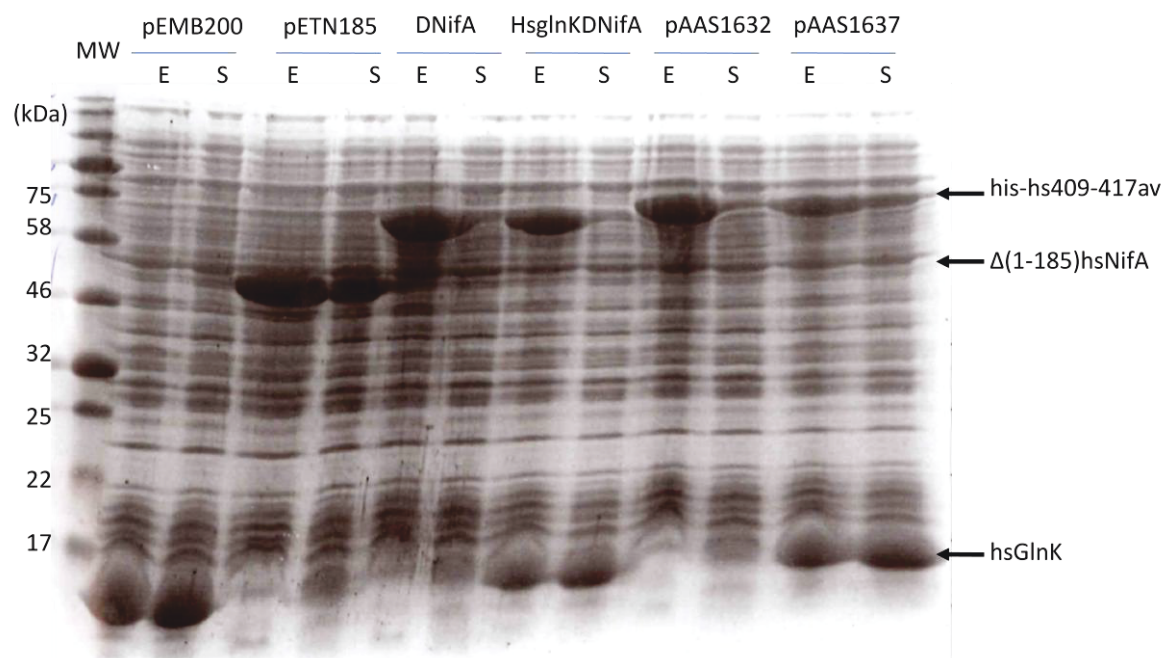


Figura 31 - Teste de expressão e solubilidade de his-hs409-417av[xhol] comparada com outras proteínas.

Células de *E. coli* JM109(λ DE3) pRT22 expressando hsGlnK, $\Delta(1-185)$ NifA, hsNifA, hsNifA + hsGlnK, his-hs409-417av[xhol], e his-hs409-417av[xhol] + hsGlnK a partir dos plasmídeos pEMB200, pETN185, DNifA, HsglnKDNifA, pAAS1632 e pAAS1637, respectivamente. As células foram ressuspensas em 400 μ L de tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl) e lisadas por sonicação. Os extratos obtidos foram centrifugados para a separação da fração solúvel. Dez microlitros de cada extrato (E) e de cada fração solúvel (S) foram aplicados em gel de poliacrilamida 15%, analisados por SDS-PAGE, e corados com corante azul de Coomassie. O marcador de massa molecular (MW) utilizado foi o *Blue Prestained Protein Standard, Broad Range* (NEB, cat. no. P7706S). Os valores à esquerda representam a massa das bandas do marcador de massa molecular em kiloDaltons.

Observa-se que hsGlnK e $\Delta(1-185)$ hsNifA são bastante solúveis neste tampão simples, ao passo que hsNifA não é nada solúvel. his-hs409-417av[xhol], por sua vez, é pouco solúvel quando expressa isoladamente, mas tem sua solubilidade aumentada quando coexpressa com hsGlnK. Uma vez que o nível de expressão de his-hs409-417av[xhol] não é idêntico a partir de pAAS1632 e pAAS1637, é difícil atribuir com certeza o aumento da solubilidade à presença de hsGlnK; é possível que tão somente o nível de expressão mais baixo a partir de pAAS1637 baste para aumentar a solubilidade da quimera neste experimento.

O resultado de um segundo teste de expressão realizado reforça a segunda possibilidade: células de *E. coli* JM109(λ DE3) contendo pAAS1637 foram cultivadas tal qual descrito acima, exceto que a expressão de his-hs409-417av[xhol] foi induzida com diferentes concentrações de IPTG. Após a expressão, as células foram colhidas, ressuspensas em tampão (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl), lisadas por sonicação,

centrifugadas, e analisadas por SDS-PAGE da mesma maneira que no experimento anterior; os resultados estão na figura 32.

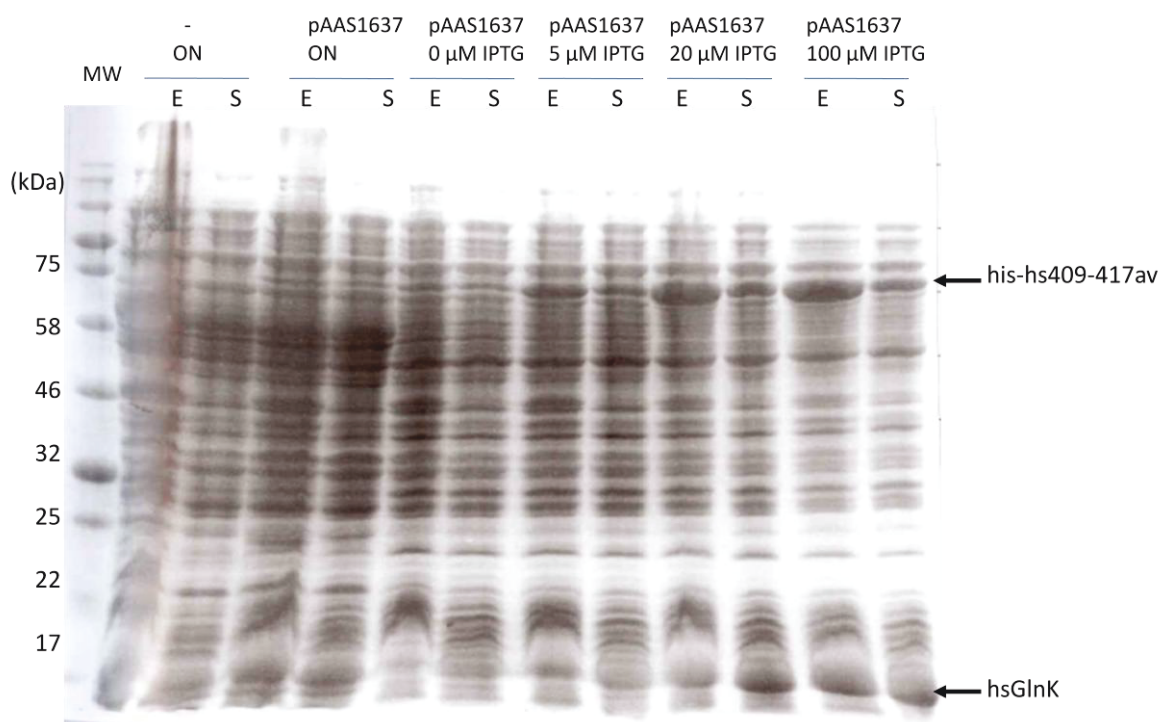


Figura 32 - Teste de expressão e solubilidade de his-hs409-417av[xhoI] expressa sob diferente níveis de indução.

Células de *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 expressando his-hs409-417av[xhoI] + hsGlnK a partir do plasmídeo pAAS1637 foram ressuspensas em 400 μL de tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl) e lisadas por sonicação. Um controle negativo (— ON”) consistiu em células de *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 sem plasmídeos adicionais; —ON”, tanto nas células controle quanto nas células contendo pAAS1632, indica uma cultura crescida durante a noite toda (*overnight*) na ausência do indutor IPTG. Os extratos obtidos foram centrifugados para a separação da fração solúvel. Dez microlitros de cada extrato (E) e de cada fração solúvel (S) foram aplicados em gel de poliacrilamida 15%, analisados por SDS-PAGE, e corados com azul de Coomassie. O marcador de peso molecular (MW) utilizado foi o *Blue Prestained Protein Standard, Broad Range* (NEB, cat. no. P7706S). Os valores à esquerda representam a massa das bandas do marcador de massa molecular em kiloDaltons.

Nas células que hospedam o plasmídeo pAAS1637, percebe-se a presença de uma banda de proteína com o padrão de migração característico de his-hs409-417av[xhoI] mesmo na ausência de indução com IPTG. O aumento progressivo da concentração de IPTG no meio de cultura leva a um aumento perceptível da produção de his-hs409-417av[xhoI] mesmo na ausência de indução com IPTG, mas com relativa perda da solubilidade. Um compromisso entre alta expressão e boa solubilidade parece ser mais bem alcançado pela indução com 20 μM de IPTG; esta condição de indução passou a ser usada nos experimentos subsequentes.

Um terceiro teste realizado avaliou a solubilidade de uso de his-hs409-417av[xhoI] em diferentes tampões. Células de *E. coli* JM109(λDE3) pRT22 contendo pAAS1637 foram cultivadas para expressão de his-hs409-417av[xhoI] conforme descrito nos dois experimentos anteriores; após a expressão, as células foram colhidas, ressuspensas em tampão diferentes tampões, lisadas por sonicação, centrifugadas, e analisadas por SDS-PAGE da mesma maneira que nos experimentos anteriores; os resultados são mostrados na figura 33.

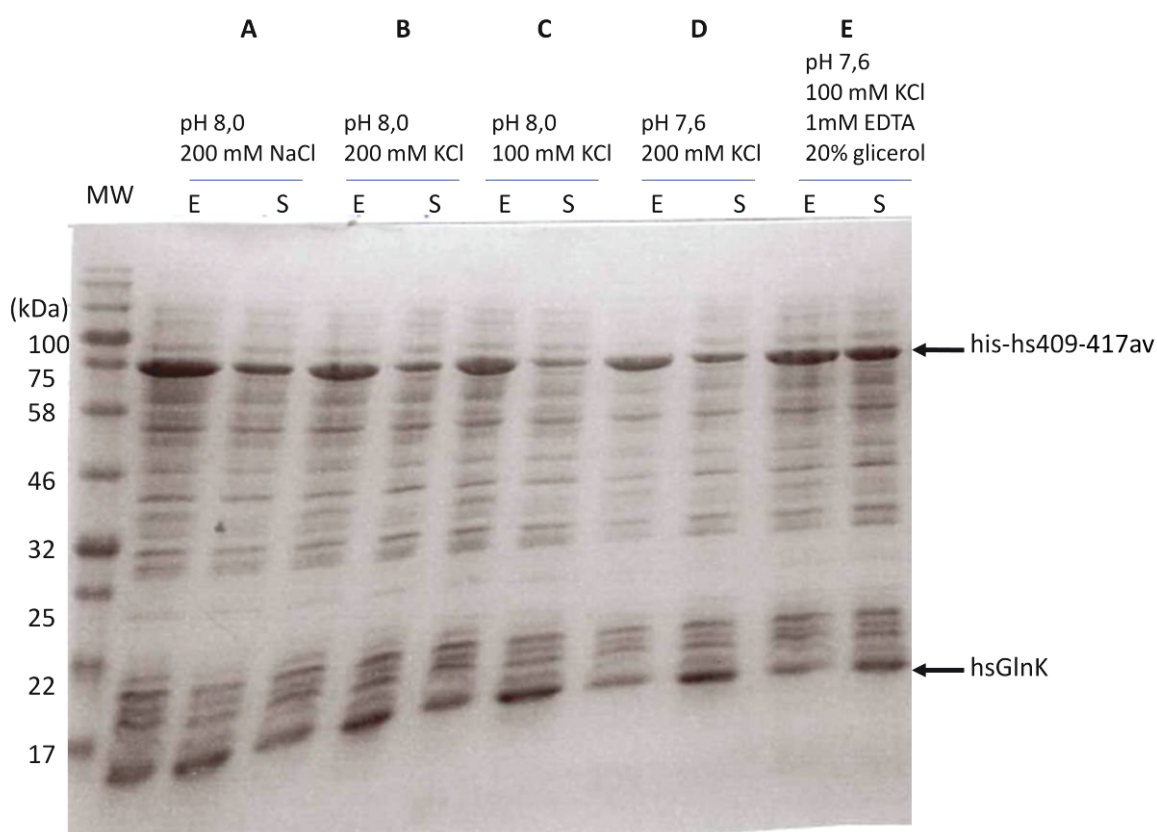


Figura 33 - Teste de solubilidade de his-hs409-417av[xhoI] em diferentes tampões.

Células de *E. coli* JM109(λDE3) expressando his-hs409-417av[xhoI] + hsGlnK a partir do plasmídeo pAAS1637 foram ressuspensas em 400 µL de diferentes tampões: (A), 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl; (B), 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl; (C), 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl; (D), 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 200 mM KCl; (E), 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glicerol. Os extratos obtidos foram centrifugados para a separação da fração solúvel. Dez microlitros de cada extrato (E) e de cada fração solúvel (S) foram aplicados em gel de poliacrilamida 15%, analisados por SDS-PAGE e corados com solução corante azul de Coomassie. O marcador de massa molecular (MW) utilizado foi o *Blue Prestained Protein Standard, Broad Range* (NEB, cat. no. P7706S). Os valores à esquerda representam a massa das bandas do marcador de massa molecular em kiloDaltons.

A substituição de 200 mM de NaCl (A) por 200 mM de KCl (B), ou de Tris-HCl pH 8,0 (A, B) por Tris-HCl pH 7,6 (D) não causou efeito perceptível sobre a solubilidade de his-hs409-417av[xhoI]. A diminuição da força iônica de 200 mM (A, B, D) para 100 mM (C), porém, ocasionou perda de solubilidade. Por fim, um aumento considerável da solubilidade

foi obtido com o uso de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glicerol), possivelmente devido à presença de alta concentração de glicerol.

5.2.18. Purificação de his-hs409-417av

Para a purificação de his-hs409-417av[xhoI], células de *E. coli* JM109(λDE3)pRT22 contendo pAAS1637 foram cultivadas conforme descrito na seção 4.5.6 (p. 83). A purificação propriamente dita foi feita em duas etapas, conforme descrito na seção 4.8.4 (p. 96). Num primeiro momento, a fração solúvel do extrato foi injetada manualmente em uma coluna Hitrap contendo heparina, e as proteínas ligadas à coluna foram eluídas com o aumento progressivo da força iônica no tampão de eluição (figura 34A). A maior parte de his-hs409-417av[xhoI] foi eluída da coluna em concentrações baixas de KCl, o que revelou-se muito útil pois essas frações contêm poucos contaminantes. As frações mais enriquecidas com his-hs409-417av[xhoI] (eluídas com 5%, 10%, 20%, e a primeira fração eluída com 100% de tampão B-hep) foram então unidas e injetadas em uma coluna Hitrap chelating carregada com íons Co^{2+} , de onde as proteínas foram eluídas com o aumento progressivo da concentração de imidazol no tampão (figura 34B). A proteína his-hs409-417av[xhoI] foi eluída majoritariamente com concentrações moderadas de imidazol, e foi coletada em estado relativamente puro; uma estimativa de pureza baseada em quantificação densitométrica das bandas de proteína resultou em 45-49% de pureza de his-hs409-417av[xhoI] após passagem pela coluna de heparina (partindo de 5-8% desta proteína na fração solúvel) e 90-97% de pureza após purificação na coluna de afinidade por cobalto.

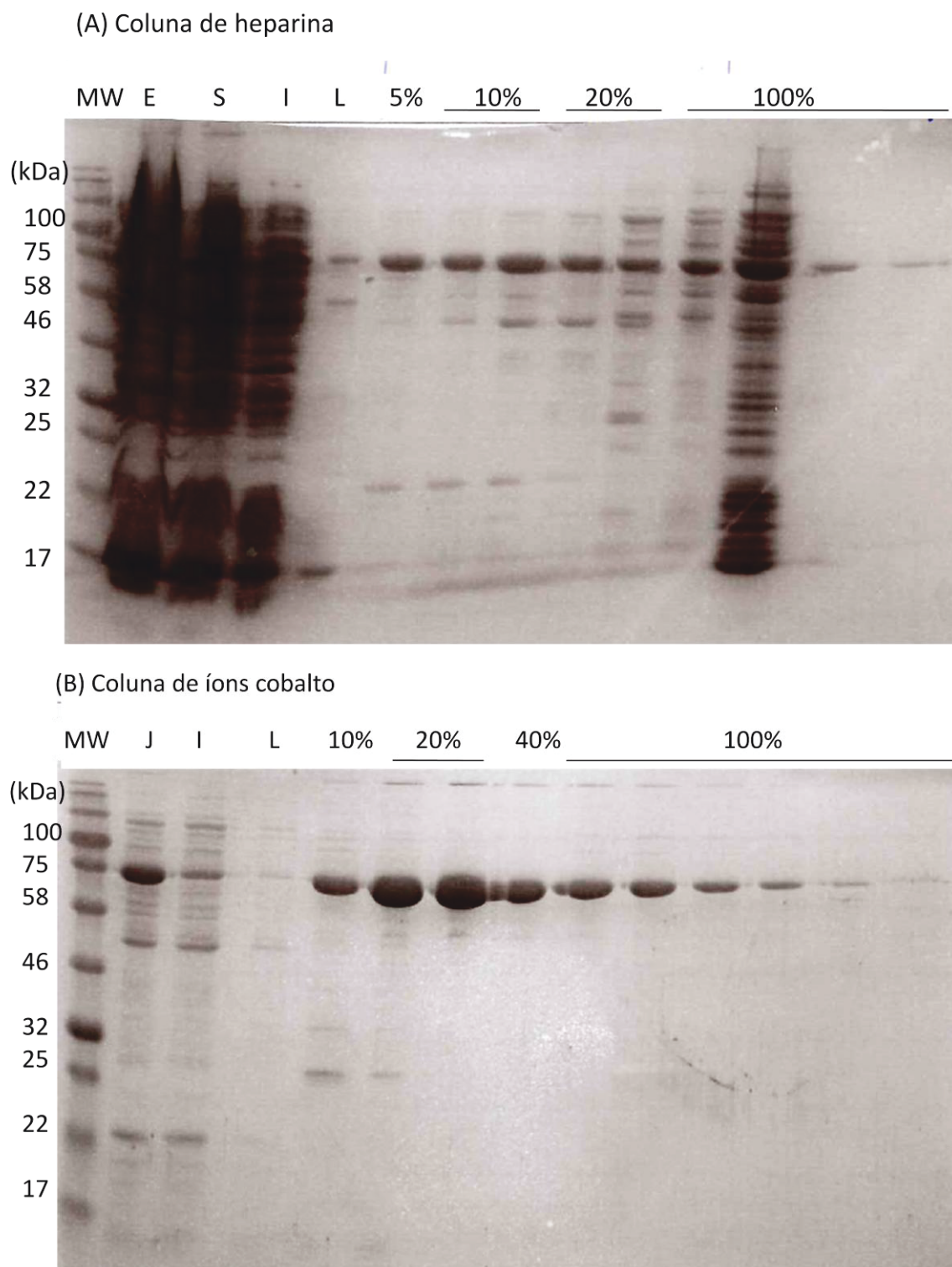


Figura 34 - Purificação de his-hs409-417av[xhoI].

(A) SDS-PAGE de frações da purificação de his-hs409-417av em coluna Hitrap Heparin. Dez microlitros de cada fração foram analisados por SDS-PAGE em gel 15%. A coloração foi feita com azul de Coomassie coloidal. MW, marcador de massa molecular (NEB#P7306S); E, extrato; S, fração solúvel; I, *flowthrough* (fração que não ligou-se à heparina durante a injeção da amostra); L, lavagem com tampão A-hep (5 mL); 5%, 10%, 20% e 100% referem-se à concentração de tampão B-hep utilizada para eluir as respectivas frações; as frações não continham todas o mesmo volume (10 mL para 5%, 2 mL para 10 e 20%, e 1 mL para 100%). (B) SDS-PAGE de frações da purificação de his-hs409-417av em coluna Hitrap Chelating Co²⁺. Dez microlitros de cada fração foram analisados por

SDS-PAGE em gel 15%. A coloração foi feita com azul de Coomassie coloidal. MW, marcador de massa molecular (NEB#P7306S); J, junção das frações relevantes da purificação em coluna de heparina (ver texto); I, *flowthrough* (fração que não ligou-se à coluna durante a injeção da amostra); L, lavagem com tampão A-co; 10%, 20%, 40% e 100% referem-se à concentração de tampão B utilizada para eluir as respectivas frações; a fração 10% continha 2 mL de amostra, e as demais 1 mL.

As frações contendo proteína his-hs409-417av[xhoI] suficientemente pura (eluídas com 10%, 20%, e 40% de tampão B-co) foram reunidas, a concentração final estimada com o método de Bradford foi de 1,85 mg/mL – um valor comparável ao obtido da purificação de $\Delta(1-185)$ hsNifA (STEFANELLO, 2014), e muito superior ao obtido com outras variantes ou fragmentos de hsNifA.

5.2.19. Análise de his-hs409-417av por cromatografia de exclusão de tamanho

Uma amostra (200 μ L) de his-hs409-417av[xhoI] purificada foi analisada por cromatografia de exclusão de tamanho em uma coluna Superose 12 10/300 GL equilibrada com tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl) em um equipamento ÄKTA Pure System (ver seção 4.8.9, p. 98), e frações foram coletadas para todos os picos de absorção de luz UV detectados. Três picos de absorbância a 260nm, um equivalente ao volume morto da coluna, outro a uma massa estimada de 130 kDa e um terceiro a uma massa estimada de 32 kDa, foram observados, e a análise das frações coletadas de cada um deles por SDS-PAGE é mostrada na figura abaixo:

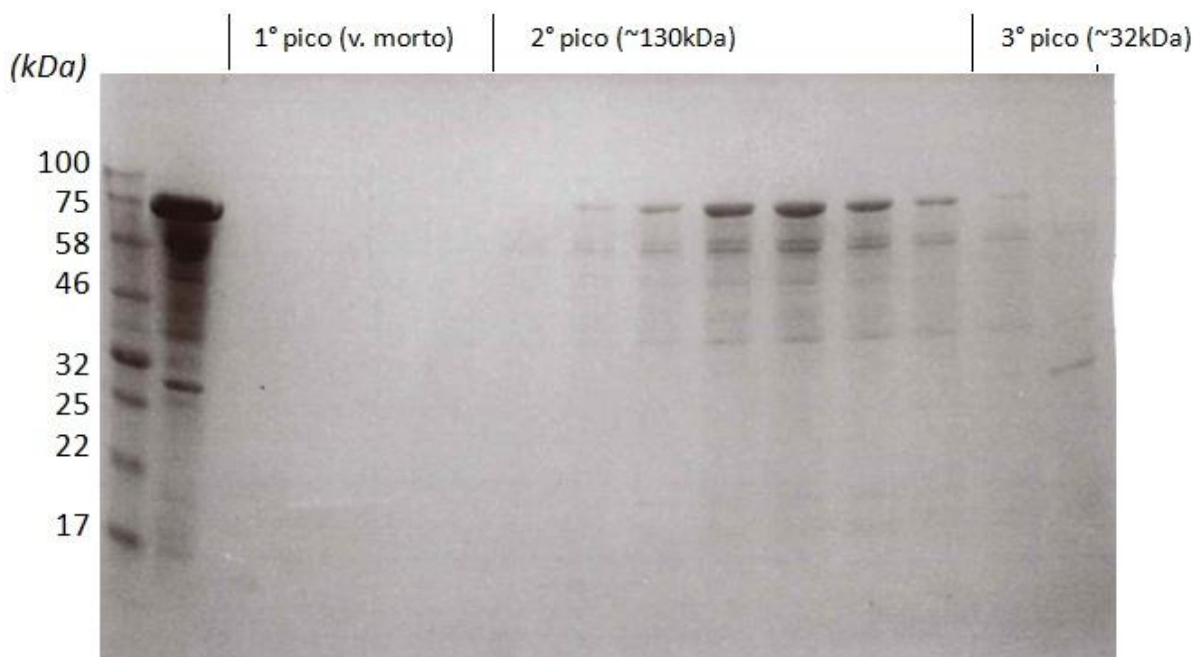


Figura 35 - Frações de his-hs409-417av eluídas durante análise por SEC em coluna Superose 12 10/300 GL.

Somente as amostras com absorvância a 260 nm acima da linha de base (um indicativo da presença de proteínas), presentes em três picos no cromatograma, foram analisadas por SDS-PAGE. MW, marcador de peso molecular (NEB#P7306S); P, amostra de his-hs409-417av.

A despeito da degradação sofrida por his-hs409-417av[xhoI] (ocorrida após a corrida, uma vez que se observa mesmo na fração que não foi injetada na coluna), nota-se que his-hs409-417av[xhoI] não aparece no volume morto da coluna, que equivale a alta massa molecular, nem no pico de proteínas com massa estimada de ~32 kDa, que contém um contaminante persistente visível na figura 34. A proteína his-hs409-417av[xhoI] aparece exclusivamente no pico equivalente a uma massa molar de ~130 kDa; uma vez que o monômero de his-hs409-417av[xhoI] possui massa molar de 60 kDa, a retenção da proteína na coluna é compatível com sua existência em solução na forma de um dímero de ~120 kDa. A forma dimérica de his-hs409-417av[xhoI] reforça o mecanismo proposto na seção 5.2.15.

5.2.20. Ensaios de interação por *pull-down*

Por fim, tentou-se observar a interação direta entre his-hs409-417av[xhoI] e hsGlnK com ensaios de *pull-down*. A proteína hsGlnK foi expressa e purificada conforme já descrito (seção 4.8.5, seção 5.1.3). É possível ver uma banda fraca recuperada do tamanho adequado para hsGlnK quando as amostras foram incubadas em ATP e 2OG (figura 36), sugerindo interação direta entre his-hs409-417av[xhoI] e GlnK.

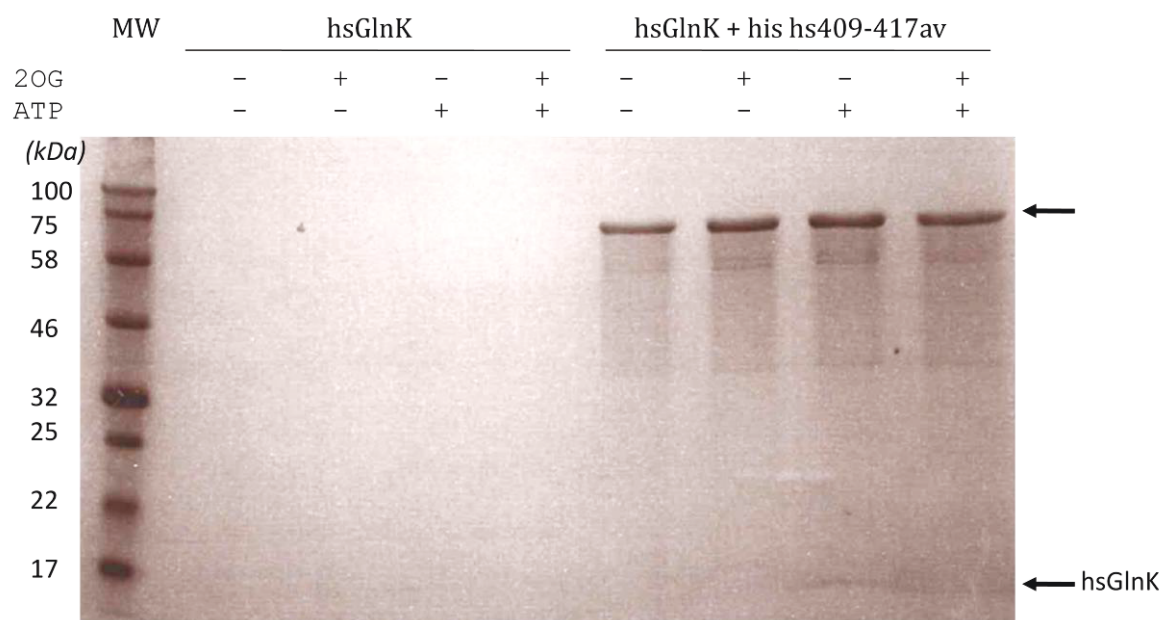


Figura 36 - Análise por SDS-PAGE de frações eluídas de MagneHis após os ensaios de interação.

Dez microlitros de cada fração foram analisados por SDS-PAGE em gel 15%. A coloração foi feita com azul de Coomassie coloidal. MW, marcador de peso molecular (NEB#P7306S); os sinais de “-” e “+” indicam a ausência (0 mM) ou presença (2 ou 3 mM) de 2OG e ATP, respectivamente.

5.3. DISCUSSÃO: MODELO DE REGULAÇÃO DE hsNifA EM RESPOSTA A AMÔNIO.

Os dados obtidos nas duas partes do trabalho permitem ampliar o modelo de regulação da proteína hsNifA por amônio, introduzindo algumas novas informações a respeito do mecanismo da inibição do domínio AAA+ pelo domínio GAF e das condições necessárias para a interação ativadora de PII.

Primeiramente, os dados obtidos no experimento de mutagênese aleatória de hs409-417av[xhoI] indicam que o domínio GAF de hsNifA possui duas regiões funcionalmente distintas, devido ao tipo de mutante que se consegue selecionar em cada uma: a região N-terminal (14-164) parece ser importante para a recepção do sinal ativador; mutações que prejudiquem sua estrutura manterão NifA inativa. A região C-terminal do GAF (176-194), por sua vez, parece importante para transmitir o sinal de inibição do GAF para o domínio central.

Essas observações sustentam um modelo de inibição de hsNifA por GAF semelhante ao proposto proposto para a regulação de NifH (BATCHELOR *et al.*, 2013), e diferente do modelo de regulação por interação intramolecular que se havia adotado até aqui. As razões para preferir o novo modelo de regulação foram discutidas em maior detalhe na seção 5.2.15. Levando em consideração os resultados obtidos nos experimentos de

mutagênese aleatória de hsNifA e o fenótipo inativador conhecido de outras quatro substituições no domínio GAF (K22V, T160E, M161V, L172R – AQUINO *et al.*, 2015), propõe-se que a região entre os resíduos 14-172 consiste na região do domínio GAF que é responsável pela dimerização de GAF e recepção do sinal ativador de hsGlnK. A região entre os resíduos 176-194, localizada na hélice que conecta os domínios GAF e AAA+, é responsável por inibir a atividade da proteína hsNifA ao forçar os domínios AAA+ a permanecerem na forma dimérica.

A desrepressão de hsNifA ocorre através de interação direta com a proteína PII. A afinidade de hsNifA por PII parece ser parte importante da regulação: GlnB ativa hsNifA quando expressa em *E. coli* (STEFANELLO *et al.*, 2014) ou em *H. seropedicae* a partir do promotor *glnK* (NOINDORF *et al.*, 2011), embora nas condições nativas hsNifA dependa de GlnK, e não de GlnB, para sua ativação. GlnB de *E. coli* também ativa hsNifA, mas somente se expressa em níveis mais elevados que os obtidos a partir do promotor *glnB* nativo (STEFANELLO, 2014). Assim, é importante considerar o possível papel da concentração de PII intracelular no modelo de ativação de hsNifA.

A simples interação entre o domínio GAF de hsNifA e hsGlnK talvez não baste para causar a desrepressão de hsNifA. É provável que PII interaja com o domínio GAF mesmo sob condições em que não há ativação (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A região de hsGlnK responsável por interagir com hsNifA não pôde ser identificada com absoluta certeza, mas o experimento de mutagênese aleatória de hsGlnK sugere que seja a face superior do trímero, onde se localiza o T-loop; no entanto, o T-loop por si mesmo não parece ser essencial. Apenas uma das substituições no T-loop (D54N) aboliu a capacidade de hsGlnK ativar hsNifA, e nenhuma das substituições de resíduos do T-loop de hsGlnK por seus equivalentes em abGlnZ (H42Q, V52S, D54S – STEFANELLO, 2014) explica a incapacidade de abGlnZ ativar hsNifA (somente a substituição L45I resta a fazer e verificar). O próprio efeito da deleção do T-loop pôde ser mais bem explicado por sua incapacidade de interagir com ATP.

A região do domínio GAF responsável por interagir com PII não pôde ser identificada ou mesmo sugerida, devido à paucidade de informações estruturais (mas ver seção 5.2.15 para algumas notas especulatórias)

Por fim, o principal causador da desrepressão de hsNifA parece ser a alteração conformacional de hsGlnK em resposta à ligação de 2-oxoglutarato a seus sítios de interação com micromoléculas. A substituição Y51F não teve efeito negativo sobre a desrepressão de NifA, indicando que a uridililação não é essencial. Por outro lado, mutante K58M de hsGlnK, que não interage com 2OG, tem sua capacidade de ativar hsNifA extremamente reduzida; sua atividade só é detectada quando superexpresso em baixa concentração de amônio. O resquício de atividade observado em baixo amônio pode ser

devido a um papel secundário da uridililação de PII para induzir a conformação ativadora (ver seção 5.1.10).

A ligação de hsGlnK a ATP/ADP, por sua vez, é absolutamente essencial para a desrepressão de hsNifA. Este efeito não parece ser devido apenas à incapacidade de ligar 2OG, visto que nem mesmo a superexpressão de hsGlnK G89A ocasionou qualquer atividade de hsNifA coexpressa, diferentemente de K58M. É tentador sugerir que a ligação a ATP a PII seja necessária para a interação com hsNifA, ao passo que a ligação de 2OG seria necessária para induzir a conformação ativadora de hsGlnK.

A figura 37 mostra uma representação gráfica do modelo proposto:

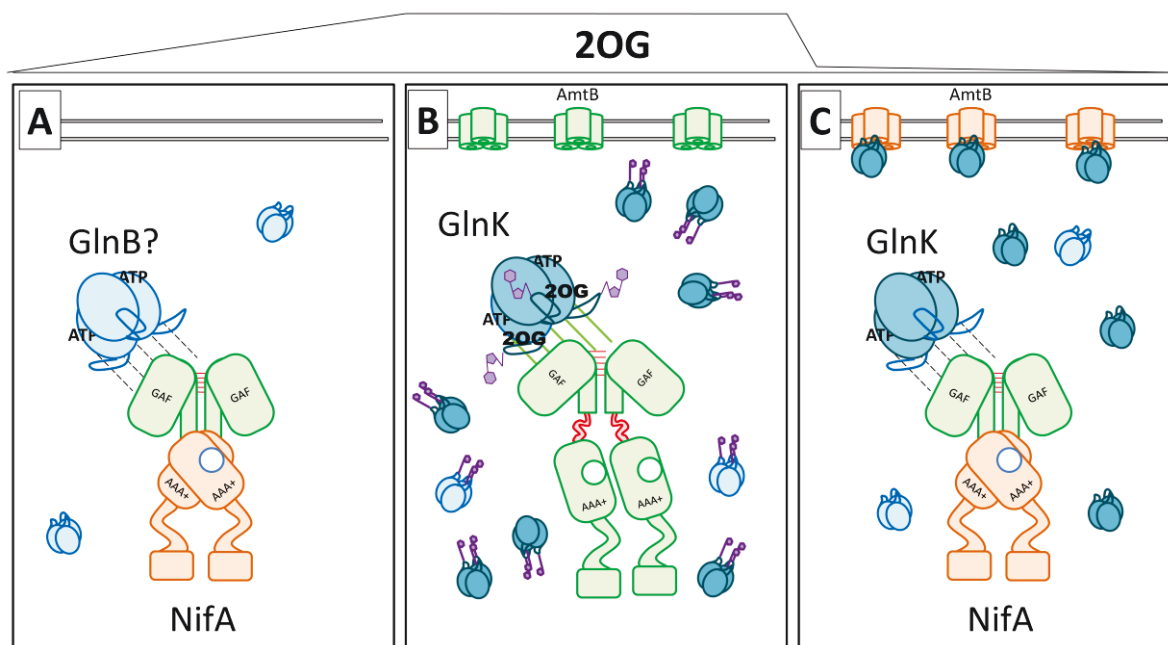


Figura 37 - Mecanismo fisiológico proposto para a regulação da atividade de hsNifA em resposta a amônio.

(A), presença de amônio. O domínio GAF dimérico de hsNifA mantém os domínios AAA+ dimerizados através da presença da hélice conectora intacta, inibindo sua atividade. GlnB é a única proteína PII presente no citoplasma, e sua concentração não é suficiente para haver interação com hsNifA; mesmo havendo interação, a concentração intracelular de 2OG é baixa demais para promover a coformação ativadora de GlnB. **(B)**, ausência de amônio. GlnK é produzida em grande quantidade a partir do operon NtrC-dependente *glnKamtB* (que também produz o transportador AmtB). GlnK ligada a 2OG interage com o domínio GAF de hsNifA de modo a causar alterações conformacionais no domínio GAF, que em última instância levam a uma desestabilização da hélice que conecta os domínios GAF e AAA+ (em vermelho). A interação GAF-GlnK envolve a face de GlnK que contém o T-loop. A uridililação não tem importância direta, e o T-loop propriamente dito provavelmente não interage. **(C)**, choque de amônio. Com o aumento súbito da concentração de amônio, GlnK é desuridililada e passa a interagir com AmtB na membrana, tornando-se menos disponível no citoplasma. Ao mesmo tempo, a ausência de 2OG converte GlnK ligada a hsNifA à sua conformação não-ativadora, permitindo que a hélice conectora entre GAF e AAA+ se reestruture, forçando os domínios AAA+ a dimerizarem-se novamente, inativando hsNifA.

O mecanismo proposto é coerente com os resultados dos experimentos realizados, mas alguns pontos específicos precisariam de comprovação antes de serem totalmente

aceitos. Notoriamente, os dados ainda não se consegue diferenciar “interação com hsGlnK” e “ativação por hsGlnK”, embora haja muitas evidências indiretas de que estes processos não sejam concomitantes. A alteração de oligomerização do domínio AAA+ nos estados ativo e inativo de hsNifA é fortemente sugerida pelos dados, mas necessitaria de uma comprovação mais direta, possivelmente a partir da caracterização da quimera his-hs409-417av.

Os dados deste trabalho, somados ao conhecimento previamente acumulado a respeito da regulação da transcrição de *hs nifA* (WASSEM *et al.*, 2000, 2002) e da atividade de hsNifA (AQUINO *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 1999, 1999b, 2001, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009, 2012; SOUZA *et al.*, 1999;) indicam que a regulação da FBN em *H. seropedicae* difere não apenas daquela descrita para γ -proteobactérias, mas também da observada na maioria das α -proteobactérias diazotróficas estudadas. A tabela 15 mostra os principais aspectos conhecidos da regulação transcricional da FBN por NifA em *H. seropedicae* e nas α -proteobactérias mais bem caracterizadas; as referências para a caracterização de cada organismo já foram discutidas na seção 1.4.2 (p. 49). Percebe-se que há pelo menos quatro modos distintos de controle da FBN entre os diazotrofos que possuem NifA sensível a oxigênio: (1) o sistema de regulação de *A. brasilense* e *R. rubrum*, no qual NifA é produzida constitutivamente e ativada por interação com o T-loop de GlnB uridililada (e não de outros parálogos de PII); (2) o sistema de regulação de *R. capsulatus*, em que há regulação da produção de NifA2 por NtrC e no qual ambas NifA1 e NifA2 têm sua atividade inibida por parálogos de PII (GlnB e GlnK); (3) o sistema de regulação presente em α -rizóbios, no qual a transcrição de *nifA* é fortemente regulada em resposta aos níveis de oxigênio, e a atividade da proteína NifA não é regulada por amônio; e por fim (4) o sistema de regulação presente em *H. seropedicae* e (pelo que se infere) *R. palustris*, no qual a transcrição de *nifA* é dependente de NtrC e a atividade de NifA é estimulada por proteínas PII, que aliviarão a inibição do domínio GAF sobre o domínio AAA+ de acordo com o modelo proposto na figura 37. A tabela 15 deixa claro que o conhecimento sobre a regulação da FBN está longe de ser completo, e a divisão dos organismos estudados em quatro modelos deve ser encarada como preliminar.

TABELA 15 – COMPARAÇÃO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DA FBN EM α E β -PROTEOBACTÉRIAS

	<i>H. seropedicae</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>R. rubrum</i>	<i>R. capsulatus</i>	<i>R. palustris</i>	Rhizobia
Expressão de <i>nifA</i> regulada?	Sim (NtrC)	Não	Não	Não (<i>nifA1</i>), sim (<i>nifA2</i>) (NtrC)	Sim (NtrC)	Sim (Fix)
Regulação por PII	Ativação por GlnK (ou GlnB)	Ativação por GlnB (e não GlnZ)	Ativação por GlnB (e não GlnK ou GlnJ)	Inativação por GlnB e GlnK	Ativação por PII (presumivelmente)	Não regulada
Uridililação de PII importante?	Não	Sim	Sim	?	?	Não
Região de PII responsável pela interação	Lateral?	T-loop	T-loop	?	?	N.D.
Resíduos do GAF implicados na interação	1-164	66-88, 165-176	173	?	?	N. D.
Mutações ativadoras	G25E, E185G, L190P, L190H, Q193P, L194P	Y18F, Y43A, Y53F,	G36E, T38P, M173(I,L,V), L184R, A243T	V42E, L66Q, [I460F, E477Q]	M202K, Q209P, L212R, S213P	N. D.

6. CONCLUSÕES

1. A interação de hsGlnK com ATP é essencial para a ativação de hsNifA, e a interação de hsGlnK com 2OG é o principal causador da ativação de hsNifA.
2. A uridililação de hsGlnK não é necessária para a ativação de hsNifA, diferentemente do observado em sistemas de regulação similares de outros organismos.
3. O T-loop da proteína hsGlnK não é a principal região de interação entre hsGlnK e hsNifA, embora possa ter um papel auxiliar.
4. A maioria das substituições em hsGlnK que a tornaram incapaz de ativar hsNifA concentraram-se na face superior do trímero de PII, na mesma superfície do T-loop, sugerindo que esta região é provavelmente responsável por interagir com hsNifA.
5. A sensibilidade de hsNifA a oxigênio pode ser removida sem prejuízo da regulação por amônio através de quimerização com NifA de *A. vinelandii* na região próxima à cisteína 414 de hsNifA.
6. A substituição C414H em $\Delta(1-185)$ NifA gera uma proteína parcialmente ativa que não sofre inibição por oxigênio.
7. A integridade da região entre os resíduos 176-194 de hsNifA, predita como uma α -hélice de conexão entre os domínios GAF e AAA+, é essencial para manter a inibição de GAF sobre AAA+.
8. A integridade da região entre os domínios 14-164 de hsNifA é essencial para a transmissão do sinal de ativação de hsGlnK para hsNifA.

REFERÊNCIAS

- ADESSI, A.; MCKINLAY, J. B.; HARWOOD, C. S.; DE PHILIPPIS, R. A. *Rhodopseudomonas palustris* *nifA*⁺ mutant produces H₂ from NH₄⁺-containing vegetable wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 21, p. 15893–15900, 2012.
- ALIBHAI, M.; VILAFRANCA, J. J. Kinetic and mutagenic studies of the role of the active site residues Asp-50 and Glu-327 of *Escherichia coli* glutamine synthetase. **Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 682–686, 1994.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ALVAREZ-MORALES, A.; DIXON, R.; MERRICK, M. Positive and negative control of the *glnA ntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. **The EMBO Journal**, n. 3, p. 501–507, 1984.
- ANANDHAM, R.; KIM, S.-J.; MOON, J. Y.; WEON, H.-Y.; KWON, S.-W. *Paraherbaspirillum soli* gen. nov., sp. nov. isolated from soil. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 262–267, 2013.
- ANDERSON, W. B.; HENNIG, S. B.; GINSBURG, A.; STADTMAN, E. R. Association of ATP: glutamine synthetase adenylyltransferase activity with the P_I component of the glutamine synthetase deadenylylation system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 67, n. 3, p. 1417–1424, 1970.
- ANDERSON, W. B.; STADTMAN, E. R. Purification and functional roles of the P_I and P_{II} components of *Escherichia coli* glutamine synthetase deadenylylation system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 143, n. 2, p. 428–443, 1971.
- ANDRADE, S. L. A.; EINSLE, O. The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. **Molecular Membrane Biology**, v. 24, n. 5–6, p. 357–365, 2007.
- AQUINO, B.; STEFANELLO, A. A.; OLIVEIRA, M. A. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; CHUBATSU, L. S. Effect of point mutations on *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p. 683–690, 2015.
- ARAÚJO, L. M.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 491–495, 2004.
- ARAÚJO, E. O.; MERCANTE, F. M.; VITORINO, A. C. T.; PAIM, L. R. Inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* in three corn genotypes under different nitrogen levels. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 21, p. 1628–1634, 2014.
- ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 12, p. 469–472, 1998.
- ARAVIND, L.; ANANTHARAMAN, V.; BALAJI, S.; BABU, M. M.; IYER, L. M. The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 231–262, 2005.
- ARCONDÉGUY, T.; HEESWIJK, W. C.; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumonia* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, n. 2, p. 263–270, 1999.

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.

ARSÈNE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4830–4838, 1996.

ARSÈNE, F.; KAMINSKI, 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 Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 339–343, 1999.

ASHOK KUMAR, T. CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server. **WIDE SPECTRUM Research Journal**, v. 1, p. 15–19, 2013.

ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 28288–28293, 1994.

ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 301–313, 1999.

ATKINSON, M. R.; BLAUWKAMP, T. A.; BONDARENKO, V.; STUDITSKY, V.; NINFA, A. J. Activation of the *glnA*, *glnK*, and *nac* promoters as *Escherichia coli* undergoes the transition from nitrogen excess growth to nitrogen starvation. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 19, p. 5358–5363, 2002.

AURORA, R.; SRINIVASAN, R.; ROSE, G. Rules for alpha-helix termination by glycine. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1126–1130, 1994.

BADAY, S.; ORABI, E. A.; WANG, S.; LAMOUREUX, G.; BERNÈCHE, S. Mechanism of NH_4^+ recruitment and NH_3 transport in Rh proteins. **Structure**, v. 23, n. 8, p. 1550–1557, 2015.

BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K.; LIPSKI, A.; BUSSE, H.-J.; PADUR, L.; WAGNER, D. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a novel member of the family Oxalobacteraceae from a glacier forefield of the Larsemann Hills, East Antarctica. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, p. 4100–4107, 2013.

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.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802–810, 1996.

BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5–6, p. 485–491, 2000.

BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B.; MORETT, E. Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 22, p. 4305–4313, 1999.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7–11, 1998.

BATCHELOR, J. D.; LEE, P. S.; WANG, A. C.; DOUCLEFF, M.; WEMMER, D. E. Structural Mechanism of GAF-Regulated σ^{54} Activators from *Aquifex aeolicus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, p. 156–170, 2013.

BATISTA, M. B.; WASSEM, R.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. Enhanced oxygen consumption in *Herbaspirillum seropedicae* fnr mutants leads to increased NifA mediated transcriptional activation. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 95, s/ p., 2015.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 14, p. 4623–4626, 1997.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; MALTEMPI DE SOUZA, E.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 13, p. 3296–3303, 2002.

BENKERT, P.; KUNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. W510–514, 2009.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, p. 343–350, 2011.

BENTLEY, W. E.; MIRJALILI, N.; ANDERSEN, D. C.; DAVIS, R. H.; KOMPALA, D. S. Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 7, p. 668–681, 1990.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235–242, 2000.

BERTANI, G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 595–600, 2004.

BEYNON, J. L.; WILLIAMS, M. K.; CANNON, F. C. Expression and functional analysis of the *Rhizobium meliloti nifA* gene. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 1, p. 7–14, 1988.

BIASINI, M.; SCHMIDT, T.; BIENERT, S.; MARIANI, V.; STUDER, G.; HAAS, J.; JOHNER, N.; SCHENK, A. D.; PHILIPPSSEN, A.; SCHWEDE, T. *OpenStructure*: an integrated software framework for computational structural biology. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 5, p. 701–709, 2013.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. W252–W258, 2014.

BIRNBAUM, S.; BAILEY, J. E. Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n.8, p.736–45, 1991.

BIRNBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–1523, 1979.

BLASCHKOWSKI, H. P.; KNAPPE, J.; LUDWIG-FESTL, M.; NEUER, G. Routes of flavodoxin and ferredoxin reduction in *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, v. 123, n. 3, p. 563–569, 1982.

BONATO, P.; ALVES, L. R.; OSAKI, J. H.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; ZHANG, N.; SCHUMACHER, J.; BUCK, M.; WASSEM, R.; CHUBATSU, L. S. The NtrY-NtrX two-component system is involved in controlling nitrate assimilation in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 21, p. 3919–3930, 2016.

BONATTO, A.C.; COUTO, G. H.; SOUZA, E. M.; ARAUJO, 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, p. 293–299, 2007.

BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; 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*. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 8, p. 643–652, 2012.

BONOMI, F.; IAMETTI, S.; MORLEO, A.; TA, D.; VICKERY, L. E. Studies on the mechanism of catalysis of iron–sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones. **Biochemistry**, v. 47, n. 48, p. 12795–12801, 2008.

BOTHE, H.; FALKENBERG, B. The reduction of flavodoxin from *Azotobacter vinelandii* by pyruvate. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 27, n. 9, p. 1090–1094, 1972.

BOYD, E. S.; ANBAR, A. D.; MILLER, S.; HAMILTON, T. L.; LAVIN, M.; PETERS, J. W. A late methanogen origin for molybdenum-dependent nitrogenase. **Geobiology**, v. 9, n. 3, p. 221–232, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRIGLE, K. E.; WEISS, M. C.; NEWTON, W. E.; DEAN, D. R. Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 4, p. 1547–1553, 1987.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 333, n. 1, p. 1–13, 2004.

BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII-regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 12, p. 2949–2953, 1971.

BUCHAN, D. W. A.; MINNECI, F.; NUGENT, T. C. O.; BRYSON, K.; JONES, D. T. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W340–W348, 2013.

BUCKSTEIN, M. H.; HE, J.; RUBIN, H. Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 2, p. 718–726, 2007.

- BUGGY, J. J.; SGANGA, M. W.; BAUER, C. E. Characterization of a light-responding trans-activator responsible for differentially controlling reaction center and light-harvesting-I gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 22, p. 6936–6943, 1994.
- BUSH, M.; GHOSH, T.; TUCKER, N.; ZHANG, X.; DIXON, R. Nitric oxide-responsive interdomain regulation targets the σ^{54} -interaction surface in the enhancer binding protein NorR. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1278–1288, 2010.
- CAMPBELL, E. A.; KAMATH, S.; RAJASHANKAR, K. R.; WU, M.; DARST, S. A. Crystal structure of *Aquifex aeolicus* σ^N bound to promoter DNA and the structure of σ^N -holoenzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 10, p. E1805–E1814, 2017.
- CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MEDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. O. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 119–132, 2013.
- CANNON, F. C.; DIXON, R. A.; POSTGATE, J. R.; PRIMROSE, S. B. Chromosomal integration of *Klebsiella* nitrogen fixation genes in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 227–239, 1974.
- CARRO, L.; RIVAS, R.; LEON-BARRIOS, M.; GONZALEZ-TIRANTE, M.; VELAZQUEZ, E.; VALVERDE, A. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., three new species isolated in Tenerife (Canary Islands). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1300–1306, 2012.
- CASTAÑO, I.; BASTARRACHEA, F. *glnF-lacZ* fusions in *Escherichia coli*: studies on *glnF* expression and its chromosomal orientation. **Molecular & General Genetics**, v. 195, n. 1–2, p. 228–233, 1984.
- CHAKRABARTI, P. Geometry of interaction of metal ions with histidine residues in protein structures. **Protein Engineering**, v. 4, n. 1, p. 57–63, 1990.
- CHAN, M.; KIM, J.; REES, D. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. **Science**, v. 260, n. 5109, p. 792–794, 1993.
- CHAUDHARY, D. K.; KIM, J. *Noviherbaspirillum agri* sp. nov., isolated from reclaimed grassland soil, and reclassification of *Herbaspirillum massiliense* (Lagier et al., 2014) as *Noviherbaspirillum massiliense* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 1508–1515, 2017.
- CHEN, S.; DU, J.; WU, L.; ZHAO, Y.; LI, J. Interaction between PII and NifA in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 170–174, 2003.
- CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, CLAUDINE; LI, J.-L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr→Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 273, n. 5, p. 415–422, 2005.
- CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3497–3500, 2003.
- CHENG, W.; ZHAN, G.; LIU, W.; ZHU, R.; YU, X.; LI, Y.; LI, Y.; WU, W.; WANG, X. Draft genome sequence of endophytic *Herbaspirillum* sp. strain WT00C, a tea plant growth-promoting bacterium. **Genome Announcements**, v. 5, p. e01719-16, 2017.

CHISNELL, J. R.; PREMAKUMAR, R.; BISHOP, P. E. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 1, p. 27–33, 1988.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; BONATTO, A. C.; HUERGO, L. F.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 197–207, 2012.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 2172–2175, 1989.

CONROY, M. J.; DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X. D.; BULLOUGH, P. A.; WINKLER, F. K.; MERRICK, M. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB–GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 1213–1218, 2007.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 4, p. 536–545, 2002.

CREWS, T.; PEOPLES, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 102, n. 3, p. 279–297, 2004.

DANYAL, K.; SHAW, S.; PAGE, T. R.; DUVAL, S.; HORITANI, M.; MARTS, A. R.; LUKOYANOV, D.; DEAN, D. R.; RAUGEI, S.; HOFFMAN, B. M.; SEEFELDT, L. C.; ANTONY, E. Negative cooperativity in the nitrogenase Fe protein electron delivery cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 40, p. E5783–E5791, 2016.

DARROW, R. A.; KNOTTS, R. R. Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 78, n. 2, p. 554–559, 1977.

DAVIS, M. C.; KESTHELY, C. A.; FRANKLIN, E. A.; MACLELLAN, S. R. The essential activities of the bacterial sigma factor. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 89–99, 2017.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments**, v. 45, p. e2565, 2010.

DING, H.; CLARK, R. J. Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. **Biochemical Journal**, v. 379, n. 2, p. 433–440, 2004.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2223–2230, 2004.

DINGLER, C.; KUHLA, J.; WASSINK, H.; OELZE, J. Levels and activities of nitrogenase proteins in *Azotobacter vinelandii* grown at different dissolved oxygen concentrations. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2148–2152, 1988.

DIXON, R. KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature reviews in Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DOBRITSA, A. P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1418–1426, 2010.

DODSWORTH, J. A.; LEIGH, J. A. Regulation of nitrogenase by 2-oxoglutarate-reversible, direct binding of a PII-like nitrogen sensor protein to dinitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 26, p. 9779–9784, 2006.

DOMBRECHT, B.; TEFAY, M.; VERRETH, C.; HEUSDENS, C.; NÁPOLES, M. C.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. The *Rhizobium etli* gene *iscN* is highly expressed in bacteroids and required for nitrogen fixation. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, n. 6, p. 820–828, 2002.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 376–382, 2010.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 13, p. 6127–6145, 1988.

DREPPER, T.; RAABE, K.; GIAOURAKIS, D.; GENDRULLIS, M.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. The Hfq-like protein NrfA of the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* controls nitrogen fixation via regulation of *nifA* and *anfA* expression. **FEMS Microbiology Letters**, v. 215, n. 2, p. 221–227, 2002.

DREPPER, T. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2203–2212, 2003.

DROZDETSKIY, A.; COLE, C.; PROCTER, J.; BARTON, G. J. JPred4: a protein secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W389–W394, 2015.

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

DURAND, A.; MERRICK, M. *In vitro* analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 29558–29567, 2006.

DUVAL, S.; DANYAL, K.; SHAW, S.; LYTLE, A. K.; DEAN, D. R.; HOFFMAN, B. M.; ANTONY, E.; SEEFELDT, L. C. Electron transfer precedes ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 41, p. 16414–16419, 2013.

ECKERT, K. A.; KUNKEL, T. A. DNA polymerase fidelity and the Polymerase Chain Reaction. **PCR Methods and Applications**, v. 1, p. 17–24, 1991.

EFRON, B. Better bootstrap confidence intervals. **Journal of the American Statistical Association**, v. 82, n. 397, p. 171–185, 1987.

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

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285–5293, 2001.

ELSEN, S.; DISCHERT, W.; COLBEAU, A.; BAUER, C. E. Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2831–2837, 2000.

ENGLEMAN, E. G.; FRANCIS, S. H. Cascade control of *E. coli* glutamine synthetase. II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 191, n. 2, p. 602–612, 1978.

EYDMANN, T.; SÖDERBÄCK, E.; JONES, T.; HILL, S.; AUSTIN, S.; DIXON, R. Transcriptional activation of the nitrogenase promoter *in vitro*: adenosine nucleotides are required for inhibition of NIFA activity by NIFL. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1186–1195, 1995.

FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281–288, 1999.

FAORO, H. **Análise genética e mutagênese sítio dirigida do gene *glnE* de *Herbaspirillum seropedicae***. 69 f. Monografia. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2004.

FAY, A. W.; BLANK, M. A.; REBELEIN, J. G.; LEE, C. C.; RIBBE, M. W.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O.; HU, Y. Assembly scaffold NifEN: A structural and functional homolog of the nitrogenase catalytic component. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 34, p. 9504–9508, 2016.

FERNANDES, G. de C.; HAUF, K.; SANT'ANNA, F. H.; FORCHHAMMER, K.; PASSAGLIA, L. M. P. Glutamine synthetase stabilizes the binding of GlnR to nitrogen fixation gene operators. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 6, p. 903–918, 2017.

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

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 352–386, 1994.

FOKINA, O.; CHELLAMUTHU, V.-R.; FORCHHAMMER, K.; ZETH, K. Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 46, p. 19760–19765, 2010.

FORCHHAMMER, K.; IRMLER, A.; KLOFT, N.; RUPPERT, U. PII signalling in unicellular cyanobacteria: analysis of redox-signals and energy charge. **Physiologia Plantarum**, v. 120, n. 1, p. 51–56, 2004.

FORCHHAMMER, K. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 65–72, 2008.

FORCHHAMMER, K.; LÜDDECKE, J. Sensory properties of the PII signalling protein family. **FEBS Journal**, v. 283, n. 3, p. 425–437, 2015.

FOWLER, D.; COYLE, M.; SKIBA, U.; SUTTON, M. A.; CAPE, J. N.; REIS, S.; SHEPPARD, L. J.; JENKINS, A.; GRIZZETTI, B.; GALLOWAY, J. N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A. F.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1621, p. 20130164–20130164, 2013.

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

FUCHS, R. L.; KEISTER, D. L. Identification of two glutamine synthetases in *Agrobacterium*. **Journal of Bacteriology**, v. 141, n. 2, p. 996–998, 1980.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Em WALKER, J. M. (ed): **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press, p. 571–607, 2005.

GEORGIADIS, M.; KOMIYA, H.; CHAKRABARTI, P.; WOO, D.; KORNUC, J.; REES, D. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Science**, v. 257, n. 5077, p. 1653–1659, 1992.

GERHARDT, E. C. M.; RODRIGUES, T. E.; MÜLLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FORCHHAMMER, K.; HUERGO, L. F. The bacterial signal transduction protein GlnB regulates the committed step in fatty acid biosynthesis by acting as a dissociable regulatory subunit of acetyl-CoA carboxylase. **Molecular Microbiology**, v. 95, n. 6, p. 1025–1035, 2015.

GIBRAT, J. F.; GARNIER, J.; ROBSON, B. Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs. **Journal of Molecular Biology**, v. 198, n. 3, p. 425–443, 1987.

GILLER, K. E.; CADISCH, G. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1–2, p. 255–277, 1995.

GINSBURG, A.; YEY, J.; HENNIG, S. B.; DENTON, M. D. Effects of adenylylation on the biosynthetic properties of the glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 9, n. 3, p. 633–649, 1970.

GLÖER, J.; THUMMER, R.; ULLRICH, H.; SCHMITZ, R. A. Towards understanding the nitrogen signal transduction for *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **The FEBS journal**, v. 275, n. 24, p. 6281–6294, 2008.

GRANT, G. A. The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 33825–33829, 2006.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2007.

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.

HALES, B. J.; CASE, E. E.; MORNINGSTAR, J. E.; DZEDA, M. F.; MAUTERER, L. A. Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Biochemistry**, v. 25, n. 23, p. 7251–7255, 1986.

HALES, L. M.; GUMPORT, R. I.; GARDNER, J. F. Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 10, p. 2999–3006, 1994.

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95–98, 1999.

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

HE, L.; SOUPENE, E.; KUSTU, S. NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 23, p. 7446–7455, 1997.

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. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 24, p. 6661–6667, 1998.

van HEESWIJK, W. C.; RABENBERG, M.; WESTERHOFF, H. V.; KAHN, D. The genes of the glutamine synthetase adenylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 443–457, 1993.

van HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 133–146, 1996.

van HEESWIJK, W. C.; WEN, D.; CLANCY, P.; JAGGI, R.; OLLIS, D. L.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers *in vivo*: Fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 3942–3947, 2000.

van HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; BOOGERD, F. C. Nitrogen assimilation in *Escherichia coli*: putting molecular data into a systems perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 628–695, 2013.

HELLING, R. B. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4571–4575, 1998.

HENIKOFF S.; HENIKOFF J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 22, p. 10915–10919, 1992

HERNANDEZ, J. A.; IGARASHI, R. Y.; SOBOH, B.; CURATTI, L.; DEAN, D. R.; LUDDEN, P. W.; RUBIO, L. M. NifX and NifEN exchange NifB cofactor and the VK-cluster, a newly isolated intermediate of the iron-molybdenum cofactor biosynthetic pathway. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 177–192, 2007.

HERNANDEZ, J. A.; CURATTI, L.; AZNAR, C. P.; PEROVA, Z.; BRITT, R. D.; RUBIO, L. M. Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11679–11684, 2008.

HERVAS, A. B.; CANOSA, I.; LITTLE, R.; DIXON, R.; SANTERO, E. NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 6123–6135, 2009.

HESKETH, A.; FINK, D.; GUST, B.; REXER, H.-U.; SCHEEL, B.; CHATER, K.; WOHLLEBEN, W.; ENGELS, A. The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 319–330, 2002.

HIGUCHI, R.; KRUMMEL, B.; SAKI, R. K. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 15, p. 7351–7367, 1988.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 5, p. 2143–2148, 1996.

HIRSCHMAN, J.; WONG, P. K.; SEI, K.; KEENER, J.; KUSTU, S. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 22, p. 7525–7529, 1985.

HO, S. N.; HUNT, H. D.; HORTON, R. M.; PULLEN, J. K.; PEASE, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, v. 77, p. 51–59, 1989.

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. **The EMBO journal**, v. 19, n. 20, p. 5288–5299, 2000.

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041–4062, 2014.

HOLLENSTEIN, K.; FREI, D. C.; LOCHER, K. P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 213–216, 2007.

HORWITZ, J. P.; CHUA, J.; CURBY, R. J.; TOMSON, A. J.; ROOGE, M. A.; FISHER, B. E.; MAURICIO, J.; KLUNDT, I. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D-glycopyranosides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 574–575, 1964.

HOSEINZADE, H.; ARDAKANI, M. R.; SHAHDI, A.; RAHMANI, H. A.; NOORMOHAMMADI, G.; MIRANSARI, M. Rice (*Oryza sativa* L.) nutrient management using mycorrhizal fungi and endophytic *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 6, p. 1385–1394, 2016.

HU, Y.; CORBETT, M. C.; FAY, A. W.; WEBBER, J. A.; HODGSON, K. O.; HEDMAN, B.; RIBBE, M. W. Nitrogenase Fe protein: a molybdate/homocitrate insertase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 46, p. 17125–17130, 2006.

HU, Y.; FAY, A. W.; LEE, C. C.; RIBBE, M. W. P-cluster maturation on nitrogenase MoFe protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10424–10429, 2007.

HU, Y.; RIBBE, M. W. Nitrogenase assembly. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1827, n. 8–9, p. 1112–1122, 2013.

HU, Y.; RIBBE, M. W. Maturation of nitrogenase cofactor—the role of a class E radical SAM methyltransferase NifB. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 31, p. 188–194, 2016.

HUALA, E.; AUSUBEL, F. M. The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 3354–3365, 1989.

HÜBNER, P.; WILLISON, J. C.; VIGNAIS, P. M.; BICKLE, T. A. Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 9, p. 2993–2999, 1991.

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

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

HUERGO, L. F.; MERRICK, M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; ARAUJO, L. M.; SOUZA, E. M. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 1523–1535, 2007.

HUERGO, L. F.; NOINDORF, L.; GIMENES, C.; LEMGRUBER, R. S. P.; CORDELLINI, D. F.; FALARZ, L. J.; CRUZ, L. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium-induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 308, n. 1, p. 40–47, 2010.

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 251–283, 2013.

HUERGO, L. F.; DIXON, R. The emergence of 2-oxoglutarate as a master regulator metabolite. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 4, p. 419–435, 2015.

HUNT, T. P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 8453–8457, 1985.

IISMAA, S. E.; WATSON, J. M. The *nifA* gene product from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* lacks the N-terminal domain found in other NifA proteins. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 943–955, 1989.

IM, W.-T.; BAE, H.-S.; YOKOTA, A.; LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 851–855, 2004.

INABA, J.; THORNTON, J.; HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; PEDROSA, F. de O.; MERRICK, M.; DE SOUZA, E. M. Mutational analysis of GlnB residues critical for NifA activation in *Azospirillum brasilense*. **Microbiological Research**, v. 171, p. 65–72, 2015.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, p. 23–28, 1990.

IPATA, P. L.; PESI, R. What is the true nitrogenase reaction? A guided approach. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 3, p. 142–144, 2015.

ISHII, S.; ASHIDA, N.; OHNO, H.; SEGAWA, T.; YABE, S.; OTSUKA, S.; YOKOTA, A.; SENOO, K. *Noviherbaspirillum denitrificans* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from rice paddy soil and *Noviherbaspirillum autotrophicum* sp. nov., a denitrifying, facultatively autotrophic bacterium isolated from rice paddy soil and proposal to reclassify *Herbaspirillum massiliense* as *Noviherbaspirillum massiliense* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1841–1848, 2017.

JACOBS, D.; MITCHELL, D.; WATT, G. D. The concentration of cellular nitrogenase proteins in *Azotobacter vinelandii* whole cells as determined by activity measurements and electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 324, n. 2, p. 317–324, 1995.

JAGGI, R.; YBARLUCEA, W.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; EDWARDS, K. J.; OLLIS, D. L.; VASUDEVAN, S. G. The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, v. 391, n. 1–2, p. 223–228, 1996.

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. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 15, n. 9, p. 894–906, 2002.

JASNIEWSKI, A. J.; SICKERMAN, N. S.; HU, Y.; RIBBE, M. W. The Fe protein: an unsung hero of nitrogenase. **Inorganics**, v. 6, n. 1, p. 25, 2018.

JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 1, p. 170–172, 2005.

JAVELLE, A.; LUPO, D.; RIPOCHE, P.; FULFORD, T.; MERRICK, M.; WINKLER, F. K. Substrate binding, deprotonation, and selectivity at the periplasmic entrance of the *Escherichia coli* ammonia channel AmtB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 13, p. 5040–5045, 2008.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; NINFA, A. J. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed *in vitro* from wild-type and mutant subunits. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 13, p. 4354–4360, 1997.

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

JIANG, P.; NINFA, A. J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1906–1911, 1999.

JIANG, P.; PIOSZAK, A. A.; NINFA, A. J. Structure–function analysis of Glutamine Synthetase Adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 4117–4132, 2007.

JIANG, P.; MAYO, A. E.; NINFA, A. J. *Escherichia coli* Glutamine Synthetase Adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49): kinetic characterization of regulation by PII, PII-UMP, glutamine, and α -ketoglutarate. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 4133–4146, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge in vitro. **Biochemistry**, v. 46, n. 45, p. 12979–12996, 2007b.

- JIANG, P.; NINFA, A. J. Reconstitution of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase Adenylyltransferase from N-Terminal and C-Terminal fragments of the enzyme. **Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 415–423, 2009.
- JIANG, P.; NINFA, A. J. α -Ketoglutarate controls the ability of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein to regulate the activities of NRII (NtrB) but does not control the binding of PII to NRII. **Biochemistry**, v. 48, n. 48, p. 11514–11521, 2009b.
- JIMÉNEZ-VICENTE, E.; NAVARRO-RODRÍGUEZ, M.; POZA-CARRIÓN, C.; RUBIO, L. M. Role of *Azotobacter vinelandii* FdxN in FeMo-co biosynthesis. **FEBS Letters**, v. 588, n. 3, p. 512–516, 2014.
- JONES, R.; HASELKORN, R. The DNA sequence of the *Rhodobacter capsulatus* *ntrA*, *ntrB* and *ntrC* gene analogues required for nitrogen fixation. **Molecular & General Genetics**, v. 215, n. 3, p. 507–516, 1989.
- JONSSON, A.; TEIXEIRA, P. F.; NORDLUND, S. The activity of adenylyltransferase in *Rhodospirillum rubrum* is only affected by α -ketoglutarate and unmodified PII proteins, but not by glutamine, vitro. **FEBS Journal**, v. 274, n. 10, p. 2449–2460, 2007.
- JONSSON, A.; NORDLUND, S. *In vitro* studies of the uridylylation of the three PII protein paralogs from *Rhodospirillum rubrum*: the transferase activity of *R. rubrum* GlnD is regulated by α -ketoglutarate and divalent cations but not by glutamine. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 3471–3478, 2007.
- JOUANNEAU, Y.; WONG, B.; VIGNAIS, P. M. Stimulation by light of nitrogenase synthesis in cells of *Rhodopseudomonas capsulata* growing in N-limited continuous cultures. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 808, n. 1, p. 149–155, 1985.
- JUNG, S.-Y.; LEE, M.-H.; OH, T.-K.; YOON, J.-H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2284–2288, 2007.
- KAKUTA, Y.; HORIO, T.; TAKAHASHI, Y.; FUKUYAMA, K. Crystal structure of *Escherichia coli* Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron–sulfur clusters. **Biochemistry**, v. 40, n. 37, p. 11007–11012, 2001.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17797–17807, 1995.
- KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. The control of *Azorhizobium caulinodans* *nifA* expression by oxygen, ammonia and by the HF-I-like protein, NrfA. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 603–613, 1998.
- KANEHISA, M.; FURUMICHI, M. TANABE, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. D353–D361, 2017.
- KAVITA, K.; METS, F.; GOTTESMAN, S. New aspects of RNA-based regulation by Hfq and its partner sRNAs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 42, p. 53–61, 2018.
- KERN, M.; KAMP, P.-B.; PASCHEN, A.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Evidence for a regulatory link of nitrogen fixation and photosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* via HvrA. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1965–1969, 1998.
- KHADKA, N.; MILTON, R. D.; SHAW, S.; LUKOYANOV, D.; DEAN, D. R.; MINTEER, S. D.; RAUGEI, S.; HOFFMAN, B. M.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of nitrogenase H_2 formation by metal-hydride protonation probed by mediated electrocatalysis and H/D isotope effects. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 38, p. 13518–13524, 2017.

- KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389–397, 1994.
- KIM, S.; BURGESS, B. K. Evidence for the direct interaction of the *nifW* gene product with the MoFe protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 16, p. 9764–9770, 1996.
- KIM, I. H.; KWAK, S. J.; KANG, J.; PARK, S. C. Transcriptional control of the *glnD* gene is not dependent on nitrogen availability in *Escherichia coli*. **Molecules and Cells**, v. 8, n. 4, p. 483–490, 1998.
- KIM, S.-J.; MOON, J.-Y.; WEON, H.-Y.; HONG, S.-B.; SEOK, S.-J.; KWON, S.-W. *Noviherbaspirillum suwonense* sp. nov., isolated from an air sample. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, p. 1552–1558, 2014.
- KINGDON, H. S.; STADTMAN, E. R. Two *E. coli* glutamine synthetases with different sensitivities to feedback effectors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 4, p. 470–473, 1967.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157–168, 2001.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, n. 1, p. 165–170, 1999.
- KLASSEN, G. Análise genética e funcional dos genes *nifENXorf1orf2* e *nifQmodABCfixXC* de *Herbaspirillum seropedicae*. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.
- KLASSEN, G.; OLIVEIRA PEDROSA, F.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Nitrogenase activity of *Herbaspirillum seropedicae* grown under low iron levels requires the products of *nifXorf1* genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 255–259, 2003.
- KLEINER, D. The transport of NH_3 and NH_4^+ across biological membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics**, v. 639, n. 1, p. 41–52, 1981.
- KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 2, p. 87–100, 1985.
- KLOSE, K. E.; NORTH, A. K.; STEDMAN, K. M.; KUSTU, S. The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein NTRC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. **Journal of Molecular Biology**, v. 241, n. 2, p. 233–245, 1994.
- KLUGKIST, J.; HAAKER, H.; WASSINK, H.; VEEGER, C. The catalytic activity of nitrogenase in intact *Azotobacter vinelandii* cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 146, n. 3, p. 509–515, 1985.
- 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 ^{15}N -dilution method. **Folia Microbiologica**, v. 48, n. 6, p. 787–793, 2003.

- KRAMER, G.; WEISS, V. Functional dissection of the transmitter module of the histidine kinase NtrB in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 2, p. 604–609, v. 19, 1999.
- KUCHO, K.; TAMARI, D.; MATSUYAMA, S.; NABEKURA, T.; TISA, L. S. Nitrogen fixation mutants of the actinobacterium *Frankia casuarinae* ccl3. **Microbes and Environments**, v. 32, n. 4, p. 344–351, 2017.
- KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of sigma 54 (NtrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiology Reviews**, v. 53, n. 3, p. 367–376, 1989.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LAGIER, J.-C.; GIMENEZ, G.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; FOURNIER, P.-E. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Herbaspirillum massiliense* sp. nov. **Standard Genomic Science**, v. 7, p. 200–209, 2012.
- LANCASTER, K. M.; ROEMELT, M.; ETTENHUBER, P.; HU, Y.; RIBBE, M. W.; NEESE, F.; BERGMANN, U.; DEBEER, S. X-ray emission spectroscopy evidences a central carbon in the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 974–977, 2011.
- LEBAUER, D. S.; TRESEDER, K. K. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. **Ecology**, v. 89, n. 2, p. 371–379, 2008.
- LEE, C. C.; BLANK, M. A.; FAY, A. W.; YOSHIKAWA, J. M.; HU, Y.; HODGSON, K. O.; HEDMAN, B.; RIBBE, M. W. Stepwise formation of P-cluster in nitrogenase MoFe protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 44, p. 18474–18478, 2009.
- LEHMAN, L. J.; ROBERTS, G. P. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 18, p. 5705–5711, 1991.
- LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 3493–3477, 2007.
- LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Molecular & General Genetics**, v. 240, n. 2, p. 188–196, 1993.
- LIANG, Z.-Y.; LAI, H.-Y.; YANG, H.; ZHANG, C.-J.; YANG, H.; WEI, H.-H.; CHEN, X.-X.; ZHAO, Y.-W.; SU, Z.-D.; LI, W.-C.; DENG, E.-Z.; TANG, H.; CHEN, W.; LIN, H. Pro54DB: a database for experimentally verified sigma-54 promoters. **Bioinformatics**, v. 33, n. 3, p. 467–469, 2017.
- LIN, H.-P. P.; REEVES, H. C. Purification and characterization of NADP⁺-specific glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 371–376, 1991.
- LIN, S.-Y.; HAMEED, A.; ARUN, A. B.; LIU, Y.-C.; HSU, Y.-H.; LAI, W.-A.; REKHA, P. D.; YOUNG, C.-C. 2013. Description of *Noviherbaspirillum malthae* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil, and proposal to reclassify *Herbaspirillum soli*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum canariense* and *Herbaspirillum psychrotolerans* as *Noviherbaspirillum soli* comb. nov., *Noviherbaspirillum aurantiacum* comb. nov., *Noviherbaspirillum canariense* comb. nov. and *Noviherbaspirillum psychrotolerans* comb. nov. based on polyphasic analysis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, 4100–4107, 2013.

LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; van HEESWIJK, 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 protein. **The EMBO Journal**, 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 transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL–NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28711–28718, 2003.

LITTLE, R.; MARTINEZ-ARGUDO, I.; PERRY, S.; DIXON, R. Role of the H domain of the histidine kinase-like protein NifL in signal transmission. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13429–13437, 2007.

LITTLE, R.; SALINAS, P.; SLAVNY, P.; CLARKE, T. A.; DIXON, R. Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission. **Molecular Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 222–235, 2011.

LIU, J.; MAGASANIK, B. The *glnB* region of the *Escherichia coli* chromosome. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7441–7449, 1993.

LLACER, J. L.; CONTRERAS, A.; FORCHHAMMER, K.; MARCO-MARIN, C.; GIL-ORTIZ, F.; MALDONADO, R.; FITA, I.; RUBIO, V. The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 45, p. 17644–17649, 2007.

LLACER, J. L.; ESPINOSA, J.; CASTELLS, M. A.; CONTRERAS, A.; FORCHHAMMER, K.; RUBIO, V. Structural basis for the regulation of NtcA-dependent transcription by proteins PipX and PII. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 35, p. 15397–15402, 2010.

LOWERY, R. G.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 32, p. 16714–16719, 1988.

LU, H.; SHI, L. Characterization of chemolithoautotrophic growth *Herbaspirillum* sp. isolated from volcanic environment in Miyake-jima island, Japan. **Advanced Materials Research**, v. 668, p. 924–927, 2013.

LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M. Is Mo involved in hydride binding by the four-electron reduced (E_4) intermediate of the Nitrogenase MoFe protein? **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2526–2527, 2010.

LUKOYANOV, D.; KHADKA, N.; YANG, Z.-Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M. Reversible photoinduced reductive elimination of H_2 from the nitrogenase dihydride state, the $E_4(4H)$ Janus intermediate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 4, p. 1320–1327, 2016.

MacFARLANE, S. A.; MERRICK, M. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 21, p. 7591–7606, 1985.

MARCHUK, D.; DRUMM, M.; SAULINO, A.; COLLINS, F. S. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 5, p. 1154, 1990.

MARTIN, E. A.; BURGESS, B. K.; IISMAA, S. E.; SMARTT, C. T.; JACOBSON, M. R.; DEAN, D. R. Construction and characterization of an *Azotobacter vinelandii* strain with mutations in the genes encoding flavodoxin and ferredoxin I. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 3162–3167, 1989.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; MARTIN-NIETO, J.; SALINAS, P.; MALDONADO, R.; DRUMMOND, M.; CONTRERAS, A. Two-hybrid analysis of domain interactions involving NtrB and NtrC two-component regulators. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 169–178, 2001.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; CONTRERAS, A. PII T-loop mutations affecting signal transduction to NtrB also abolish yeast two-hybrid interactions. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 13, p. 3746–3748, 2002.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; SALINAS, P.; MALDONADO, R.; CONTRERAS, A. Domain interactions on the *ntr* signal transduction pathway: two-hybrid analysis of mutant and truncated derivatives of histidine kinase NtrB. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 200–206, 2002b.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 601–610, 2004.

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. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1731–1744, 2004b.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; DIXON, R. A crucial arginine residue is required for a conformational switch in NifL to regulate nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16316–16321, 2004c.

MARUSIK, R.; SERGEANT, A. A simple method for dialysis of small-volume samples. **Analytical Biochemistry**, v. 105, n.2, p. 403–404, 1980.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1141–1157, 2010.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W.; PÜHLER, A.. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **Molecular and General Genetics**, v. 212, n. 1, p. 27–37, 1988.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 2, p. 80–90, 1996.

MASUDA, S.; BAUER, C. E. Null mutation of HvrA compensates for loss of an essential *relA/spoT*-like gene in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 1, p. 235–239, 2003.

MAURIZI, M. R.; GINSBURG, A. Reactivation of glutamine synthetase from *Escherichia coli* after auto-inactivation with L-methionine-S-sulfoximine, ATP, and Mn²⁺. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 4271–4278, 1982.

McCLEARY, W. R.; STOCK, J. B. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 31567–31572, 1994.

McKINLAY, J. B.; HARWOOD, C. S. Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 26, p. 11669–11675, 2010.

MEERS, R. E.; STADTMAN, E. R. Glutamate synthase from *Escherichia coli*, an iron-sulfide flavoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 7407–7419, 1972.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 604–622, 1995.

MERRICK, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 763, 2015.

MICHEL-REYDELLET, N; KAMINSKI, P. A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 8, p. 2655–2658, 1998.

MILLER, J. H. 1972. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 352–355.

MILLER, J. M. **The role of *fixX* in electron bifurcation**. 66 f. Dissertação (Master of Science), Department of Chemistry & Biochemistry, University of Montana, 2016.

MONEY, T.; BARRETT, J.; DIXON, R.; AUSTIN, S. Protein-protein interactions in the complex between the enhancer binding protein NIFA and the sensor NIFL from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1359–1368, 2001.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS letters**, v. 447, n. 2–3, p. 283–286, 1999.

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 microbiology letters**, v. 180, n. 2, p. 157–161, 1999b.

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 Letters**, v. 508, p. 1–4, 2001.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; GEOFFREY YATES, M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression, purification, and functional analysis of the C-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Expression and Purification**, v. 27, n. 2, p. 313–318, 2003.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Fnr is involved in oxygen control of *Herbaspirillum seropedicae* N-Truncated NifA protein activity in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1527–1531, 2003a.

MORETT, E; BUCK, M. NifA-dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9401–9405, 1988.

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

MOSHIRI, F.; CROUSE, B. R.; JOHNSON, M. K.; MAIER, R. J. The "nitrogenase-protective" FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: overexpression, characterization, and crystallization. **Biochemistry**, v. 34, n. 40, p. 12973–12982, 1995.

MOURE, V. R.; RAZZERA, G.; ARAÚJO, L. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; GERHARDT, E. M.; MÜLLER-SANTOS, M.; ALMEIDA, F.; PEDROSA, F. O.; VALENTE, A. P.; SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F. Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein Expression and Purification**, v. 81, p. 83–88, 2011.

MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z.-Y.; WENDROTH, S.; MULLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F. O.; SCARDUELLI, M.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; SEEFELDT, L. C. The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, 2012.

MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z.-Y.; WENDROTH, S.; MÜLLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F. O.; SCARDUELLI, M.; GERHARDT, E. M.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; SEEFELDT, L. C. The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, 2013.

NEIVERTH, A.; DELAI, S.; GARCIA, D. M.; SAATKAMP, K.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. de O.; GUIMARÃES, V. F.; DOS SANTOS, M. F.; VENDRUSCOLO, E. C. G.; DA COSTA, A. C. T. Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **European Journal of Soil Biology**, v. 64, p. 1–5, 2014.

NINFA, A. J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 16, p. 5909–5913, 1983.

NINFA, E. G.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; NINFA, A. J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 7024–7032, 1993.

NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 4, 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*. **Archives of Microbiology**, v. 185, n. 1, p. 55–62, 2005.

NOINDORF, L.; BONATTO, A. C.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B.; CHUBATSU, L. S. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 8, 2011.

NORDLUND, S.; HÖGBOM, M. ADP-ribosylation, a mechanism regulating nitrogenase activity. **FEBS Journal**, v. 280, n. 15, p. 3484–3490, 2013.

NOVELLO, E. E. G. **Caracterização funcional de uma globina putativa codificada pelo gene hsero_2872 de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências –

Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 168–173, 2005.

ODA, Y.; SAMANTA, S. K.; REY, F. E.; WU, L.; LIU, X.; YAN, T.; ZHOU, J.; HARWOOD, C. S. Functional genomic analysis of three nitrogenase isozymes in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 22, p. 7784–7794, 2005.

OETJEN, J.; REINHOLD-HUREK, B. Characterization of the DraT/DraG system for posttranslational regulation of nitrogenase in the endophytic Betaproteobacterium *Azoarcus* sp. strain BH72. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 11, p. 3726–3735, 2009.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197–200, 1996.

OLIVEIRA, M. A. S.; BAURA, V. A.; AQUINO, B.; HUERGO, L. F.; KADOWAKI, M. A. S.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; PEDROSA, F. O.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A. Role of conserved cysteine residues in *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 6, 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 NH_4^+ -regulation. **Biochimie**, v. 94, n. 4, p. 1041–1047, 2012.

OLIVEIRA, M. A. S.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. 2-Oxoglutarate levels control adenosine nucleotide binding by *Herbaspirillum seropedicae* PII proteins. **FEBS Journal**, v. 282, p. 4797–4809, 2015.

PAHEL, G.; ROTHSTEIN, D. M.; MAGASANIK, B. Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 1, p. 202–213, 1982.

PANKIEVICZ, V. C. S.; AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M. J.; ARISI, A. C. M.; STEFFENS, MARIA. B.R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass–bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, p. 907–919, 2015.

PARTE, A. C. LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic acids Research**, v. 42, n. D1, p. D613–D616, 2014.

PASCHEN, A.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating *nif* gene expression in the presence of ammonium. **FEMS microbiology letters**, v. 200, n. 2, 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*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 17, p. 5240–5247, 2003.

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

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; AYUB, R. A.; COLAUTO, N. B.; FERNANDEZ, M. A.; FUNGARO, M. H. P.; GRISARD, E. C.; HUNGRIA, M.; MADEIRA, H. M. F.; NODARI, R. O.; OSAKU, C. A.; PETZL-ERLER, M. L.; TERENCE, H.; VIEIRA, L. G. E.; STEFFENS, M. B. R.; WEISS, V. A.; PEREIRA, L. F. P.; ALMEIDA, M. I. M.; ALVES, L. R.; MARIN, A. M.; ARAUJO, L. M.; BALSANELLI, E.; BAURA, V. A.; CHUBATSU, L. S.; FAORO, H.; FAVETTI, A.; FRIEDERMANN, G.; GLIENKE, C.; KARP, S.; KAVA-CORDEIRO, V.; RAITTZ, R. T.; RAMOS, H. J. O.; RIBEIRO, E. M. S. F.; RIGO, L. U.; ROCHA, S. N.; SCHWAB, S.; SILVA, A. G.; SOUZA, E. M.; TADRA-SFEIR, M. Z.; TORRES, R. A.; DABUL, A. N. G.; SOARES, M. A. M.; GASQUES, L. S.; GIMENES, C. C. T.; VALLE, J. S.; CIFERRI, R. R.; CORREA, L. C.; MURACE, N. K.; PAMPHILE, J. A.; PATUSSI, E. V.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A.; ROCHA, C. L. M. S. C.; ARANTES, O. M. N.; FURLANETO, M. C.; GODOY, L. P.; OLIVEIRA, C. E. C.; SATORI, D.; VILAS-BOAS, L. A.; WATANABE, M. A. E.; DAMBROS, B. P.; GUERRA, M. P.; MATHIONI, S. M.; SANTOS, K. L.; STEINDEL, M.; VERNAL, J.; BARCELLOS, F. G.; CAMPO, R. J.; CHUEIRE, L. M. O.; NICOLÁS, M. F.; PEREIRA-FERRARI, L.; SILVA, J. L. C.; GIOPOPO, N. M. R.; MARGARIDO, V. P.; MENCK-SOARES, M. A.; PINTO, F. G. S.; SIMÃO, R. C. G.; TAKAHASHI, E. K.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, p. e1002064, 2011.

PEREIRA, J. A. R.; CAVALCANTE, V. A.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. In: **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. [s.l.] Springer Netherlands, p. 219–224, 1989.

PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, n. 2, p. 217–221, 2000.

PIOSZAK, A. A.; JIANG, P.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. **Biochemistry**, v. 39, n. 44, p. 13450–13461, 2000.

POPE, M. R.; MURRELL, S. A.; LUDDEN, P. W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphoribosylation of a specific arginine residue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 10, p. 3173–3177, 1985.

PORTER, S. C.; NORTH, A. K.; WEDEL, A. B.; KUSTU, S. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. **Genes & Development**, v. 7, n. 11, p. 2258–2273, 1993.

PRASSE, D.; FÖRSTNER, K. U.; JÄGER, D.; BACKOFEN, R.; SCHMITZ, R. A. sRNA154 a newly identified regulator of nitrogen fixation in *Methanosarcina mazei* strain Gö1. **RNA Biology**, v. 14, n. 11, p. 1544–1558, 2017.

PROBER, J. M.; TRAINOR, G. L.; DAM, R. J.; HOBBS, F. W.; ROBERTSON, C. W.; ZAGURSKY, R. J.; COCUZZA, A. J.; JENSEN, M. A.; BAUMEISTER, K. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. **Science**, v. 238, p. 336–341, 1987.

PY, B.; GEREZ, C.; HUGUENOT, A.; VIDAUD, C.; FONTECAVE, M.; OLLAGNIER DE CHOUDENS, S.; BARRAS, F. The ErpA/NfuA complex builds an oxidative resistant Fe-S cluster delivery pathway. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc.RA118.002160, 2018 (*in press*).

RAABE, K.; DREPPER, T.; RIEDEL, K.-U.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. The H-NS-like protein HvrA modulates expression of nitrogen fixation genes in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* by binding to selected *nif* promoters. **FEMS Microbiology Letters**, v. 216, n. 2, p. 151–158, 2002.

RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins are ATPases whose activity is regulated by 2-oxoglutarate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 32, p. 12948–12953, 2013.

RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987–994, 2004.

RAINA, R.; BAGESHWAR, U. K.; DAS, H. K. The *Azotobacter vinelandii* *nifL*-like gene: nucleotide sequence analysis and regulation of expression. **Molecular and General Genetics**, v. 237, n. 3, p. 400–406, 1993.

RAJENDRAN, C.; GERHARDT, E. C. M.; BJELIC, S.; GASPERINA, A.; SCARDUELLI, M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; MERRICK, M.; SOUZA, E. M.; WINKLER, F. K.; HUERGO, L. F.; LI, X.-D. Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of PII-target interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 47, p. 18972–18976, 2011.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 3, p. 541–554, 2004.

REGO, F. G. ; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. The expression of *nifB* gene from *Herbaspirillum seropedicae* is dependent upon the NifA and RpoN proteins. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 1199–1207, 2006.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 7, p. 1979–1983, 1985.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. **Cell**, v. 45, n. 6, p. 785–792, 1986.

REMMERT, M.; BIEGERT, A.; HAUSER, A.; SODING, J. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. **Nature Methods**, v. 9, p. 173–175, 2012.

RENDINA, A. R.; ORME-JOHNSON, W. H. Glutamate synthase: the kinetic mechanism of the enzyme from *Escherichia coli* W. **Biochemistry**, v. 17, n. 25, p. 5388–5393, 1978.

REY, F. E.; HEINIGER, E. K.; HARWOOD, C. S. Redirection of metabolism for biological hydrogen production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1665–1671, 2007.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Mutant forms of the *Azotobacter vinelandii* transcriptional activator NifA resistant to inhibition by the NifL regulatory protein. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 24, p. 6777–6785, 2002.

RIBBE, M. W.; HU, Y.; HODGSON, K. O.; HEDMAN, B. Biosynthesis of nitrogenase metallocusters. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4063–4080, 2014.

RICCI, J. C. D.; HERNÁNDEZ, M. E. Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 79–108, 2000.

RICE, P. A.; YANG, S.; MIZUUCHI, K.; NASH, H. A. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1295–1306, 1996.

ROCHA, R. A.; WESCHENFELDER, T. A.; DE CASTILHOS, F.; DE SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F.; MITCHELL, D. A. Mathematical model of the binding of allosteric effectors to the *Escherichia coli* PII signal transduction protein GlnB. **Biochemistry**, v. 52, n. 15, p. 2683–2693, 2013.

RONCATO-MACCARI, L. D. .; RAMOS, H. J. .; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS microbiology ecology**, v. 45, n. 1, p. 39–47, 2003.

ROSCONI, F.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; PLATERO, R. A.; GONZÁLEZ, C.; GONZÁLEZ, M.; BATISTA, S.; GILL, P. R.; FABIANO, E. R. Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of *nifH* and *nifA* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 2, p. 214–219, 2006.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1341–1348, 2006.

RUDNICK, P.; KUNZ, C.; GUNATILAKA, M. K.; HINES, E. R.; KENNEDY, C. Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA Activity in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 812–820, 2002.

SAARI, L. L.; TRIPLETT, E. W.; LUDDEN, P. W. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.259, p. 15502–15508, 1984.

SACOMBOIO, E. N. M.; KIM, E. Y. S.; CORREA, H. L. R.; BONATO, P.; PEDROSA, F. de O.; DE SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; MÜLLER-SANTOS, M. The transcriptional regulator NtrC controls glucose-6-phosphate dehydrogenase expression and polyhydroxybutyrate synthesis through NADPH availability in *Herbaspirillum seropedicae*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13546, 2017.

SAKAMOTO, N.; KOTRE, A. M.; SAVAGEAU, M. A. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 2, p. 775–783, 1975.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

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

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; BURLINGAME, A. L.; KOSHLAND Jr, D. E. Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 15, p. 5117–5122, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANT'ANNA, F. H.; TRENTINI, D. B.; DE SOUTO WEBER, S.; CECAGNO, R.; SILVA, S. C.; SCHRANK, I. S. The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, n. 4, p. 322–336, 2009.

SANTOS, P. C.; SMITH, A. D.; FRAZZON, J.; CASH, V. L.; JOHNSON, M. K.; DEAN, D. R. Iron-Sulfur Cluster assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19705–19711, 2004.

SANTOS, J. S.; VIANA, T. O.; JESUS, C. M.; BBALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S.R. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 39, p.78–85, 2015.

SCHLESIER, J.; ROHDE, M.; GERHARDT, S.; EINSLE, O. A conformational switch triggers nitrogenase protection from oxygen damage by Shethna protein II (FeSII). **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 1, p. 239–247, 2015.

SCHWAB, S. **Identificação e análise de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio**. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SCHWAB, S.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PERSUHN, D. C.; STEFFENS, M. B. R.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U. The *glnAntrBC* operon of *Herbaspirillum seropedicae* is transcribed by two oppositely regulated promoters upstream of *glnA*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 100–105, 2007.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 701–722, 2009.

SENIOR, J. P. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. **Journal of Bacteriology**, v. 123, n. 2, p. 407–418, 1975.

SHAH, V. K.; BRILL, W. J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3249–3253, 1977.

SHAH, V. K.; ALLEN, J. R.; SPANGLER, N. J.; LUDDEN, P. *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase: purification and characterization of NifB cofactor, the product of NifB protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p.1154–1158, 1994.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R. 5-Adenylyl-O-tyrosine. The novel phosphodiester residue of adenylylated glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 13, p. 3769–3771, 1968.

SHAPIRO, B. M. Glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. **Biochemistry**, v. 8, n. 2, p. 659–670, 1969.

SHARKEY, M. A.; ENGEL, P. C. Apparent negative co-operativity and substrate inhibition in overexpressed glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281, n. 2, p. 132–139, 2008.

SHINGLER, V. Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 409–416, 1996.

SIMPSON, F.; BURRIS, R. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, n. 4653, p. 1095–1097, 1984.

SLAVNY, P.; LITTLE, R.; SALINAS, P.; CLARKE, T. A.; DIXON, R. Quaternary structure changes in a second Per-Arnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 61–75, 2010.

SODERBACK, E.; REYES-RAMIREZ, F.; EYDMANN, T.; AUSTIN, S.; HILL, S.; DIXON, R. The redox- and fixed nitrogen-responsive regulatory protein NIFL from *Azotobacter vinelandii* comprises discrete flavin and nucleotide-binding domains. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 179–192, 1998.

SOTOMAIOR, P.; ARAÚJO, L. M.; NISHIKAWA, C. Y.; HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M. Effect of ATP and 2-oxoglutarate on the *in vitro* interaction between the NifA GAF domain and the GlnB protein of *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 12, p. 1135–1140, 2012.

SOUPENE, E.; HE, H.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 7030–7034, 1998.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 425–429, 1991.

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. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 7, p. 1511–1522, 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, n. 2, p. 681–684, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; MACHADO, H. B.; RIGO, L. U.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the –24/–12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, n. 6, p. 1407–1418, 2000.

SOUZA, A. L. F. **Caracterização molecular dos genes *fdxA*, *modB2*, *modE1* e *modE2* de *Herbaspirillum seropedicae***. 140 f. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SOUZA, A. L. F.; INVITTI, A. L.; REGO, F. G. M.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U. The involvement of the nif-associated ferredoxin-like genes *fdxA* and *fdxN* of *Herbaspirillum seropedicae* in nitrogen fixation. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 77–83, 2010.

SPIPKER, T.; ULUER, A. Z.; MARTY, FF. M.; YEH, W. W.; LEVISON, J. H.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. Recovery of *Herbaspirillum* species from persons with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2774–2777, 2008.

STEFANELLO, A. A. **Mutagênese e análise funcional do domínio N-terminal de NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. 89 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

STEFANELLO, A. A. **Identificação de resíduos de aminoácidos importantes para a ativação de NifA por PII em *Herbaspirillum seropedicae***. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 183–215, 2000.

STRÖSSER, J.; LÜDKE, A.; SCHAFFER, S.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network

of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 132–147, 2004.

STUDHOLME, D. J.; DIXON, R. Domain architectures of σ^{54} -dependent transcriptional activators. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1757–1767, 2003.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, p. 113–130, 1986.

SULLIVAN, J. T.; BROWN, S. D.; RONSON, C. W. The NifA-RpoN regulon of *Mesorhizobium loti* strain R7A and its symbiotic activation by a novel LacI/GalR-family regulator. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53762, 2013.

SUNDARARAMAN, A.; SRINIVASAN, S.; LEE, S. S. *Noviherbaspirillum humi* sp. nov., isolated from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, p. 697–704, 2016.

SZETO, W. W.; NIXON, B. T.; RONSON, C. W.; AUSUBEL, F. M. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 4, p. 1423–1432, 1987.

TAKETO, A. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 949, p. 318–324, 1988.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TEIXEIRA, P. F.; JONSSON, A.; FRANK, M.; WANG, H.; NORDLUND, S. Interaction of the signal transduction protein GlnJ with the cellular targets AmtB1, GlnE and GlnD in *Rhodospirillum rubrum*: dependence on manganese, 2-oxoglutarate and the ADP/ATP ratio. **Microbiology**, v. 154, n. 8, p. 2336–2347, 2008.

TEZCAN, F. A.; KAISER, J. T.; MUSTAFI, D.; WALTON, M. Y.; HOWARD, J. B.; REES, D. C. Nitrogenase complexes: multiple docking sites for a nucleotide switch protein. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1377–1380, 2005.

THIEL, T. Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 19, p. 6276–6286, 1993.

THORNELEY, R. N. F.; LOWE, D. J. **Molybdenum Enzymes**. Spiro, TG., editor. New York: Wiley, p. 221–284, 1985.

TUCKER, N. P.; GHOSH, T.; BUSH, M.; ZHANG, X.; DIXON, R. Essential roles of three enhancer sites in σ^{54} -dependent transcription by the nitric oxide sensing regulatory protein NorR. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 4, p. 1182–1194, 2010.

TULI, R.; MERRICK, M. J. Over-production and characterization of the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae* – the transcriptional activator of *nif* gene expression. **Journal of General Microbiology**, v. 134, n. 2, p. 425–432, 1988.

TURNBOUGH, C. L.; SWITZER, R. L. Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 266–300, 2008.

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.

TRUE, A. E.; MCLEAN, P.; NELSON, M. J.; ORME-JOHNSON, W. H.; HOFFMAN, B. M. Comparison of wild-type and *nifV* mutant molybdenum-iron proteins of nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae* by ENDOR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 2, p. 651–657, 1990.

TSUJIMOTO, R.; KAMIYA, N.; FUJITA, Y. Identification of a cis-acting element in nitrogen fixation genes recognized by CnfR in the nonheterocystous nitrogen-fixing cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. **Molecular Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 411–424, 2016.

UENO-NISHIO, S.; MANGO, S.; REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Identification and regulation of the *glnL* operator-promoter of the complex *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 160, n. 1, p. 379–384, 1984.

UHRIG, R. G.; NG, K. K. S.; MOORHEAD, G. B. G. PII in higher plants: a modern role for an ancient protein. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 9, p. 505–511, 2009.

VALENTINE, R. C.; SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R. Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 7, n. 6, p. 2143–2152, 1968.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.-M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1979–1983, 2003.

VERONESE, F. M.; BOCCU, E.; CONVENTI, L. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: Induction, purification and properties of the enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 377, n. 2, p. 217–228, 1975.

VIDANGOS, N.; MARIS, A. E.; YOUNG, A.; HONG, E.; PELTON, J. G.; BATCHELOR, J. D.; WEMMER, D. E. Structure, function, and tethering of DNA-binding domains in σ^{54} transcriptional activators. **Biopolymers**, v. 99, n. 12, p. 1082–1096, 2013.

VITOUSEK, P. M.; ABER, J. D.; HOWARTH, R. W.; LIKENS, G. E.; MATSON, P. A.; SCHINDLER, D. W.; SCHLESINGER, W. H.; TILMAN, D. G. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological Applications**, v. 7, n. 3, p. 737–750, 1997.

WANG, Y.-K.; LEE, J. H.; BREWER, J. M.; HOOVER, T. R. A conserved region in the σ^{54} -dependent activator DctD is involved in both binding to RNA polymerase and coupling ATP hydrolysis to activation. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 373–386, 1997.

WANG, L.; ZHANG, L.; LIU, Z.; ZHAO, D.; LIU, X.; ZHANG, B.; XIE, J.; HONG, Y.; LI, P.; CHEN, S.; DIXON, R.; LI, J. A minimal nitrogen fixation gene cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 enables expression of active nitrogenase in *Escherichia coli*. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 10, p. e1003865, 2013.

WANG, J.; YAN, D.; DIXON, R.; WANG, Y.-P. Deciphering the principles of bacterial nitrogen dietary preferences: a strategy for nutrient containment. **mBio**, v. 7, n. 4, p. e00792-16, 2016.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009.

- WARREN, D. J. Preparation of highly efficient electrocompetent *Escherichia coli* using glycerol/mannitol density step centrifugation. **Analytical Biochemistry**, v. 413, p. 206–207, 2011.
- WASSEM, R.; SOUZA, E M DE; 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.
- WASSEM, R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; REGO, F. G. .; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, n. 2, p. 177–192, 2002.
- WEBER, O B; BALDANI, V L D; TEIXEIRA, K. R. S. KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, n. 1, p. 103–113, 1999.
- WEBER, O. B.; CRUZ, L. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.3, p. 201–205, 2001.
- WEIDENBACH, K.; EHLERS, C.; KOCK, J.; EHRENREICH, A.; SCHMITZ, R. A. Insights into the NrpR regulon in *Methanosarcina mazei* Gö1. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 3, p. 319–332, 2008.
- WEIDENBACH, K.; EHLERS, C.; SCHMITZ, R. A. The transcriptional activator NrpA is crucial for inducing nitrogen fixation in *Methanosarcina mazei* Gö1 under nitrogen-limited conditions. **FEBS Journal**, v. 281, n. 15, p. 3507–3522, 2014.
- WEIDENHAUPT, M.; ROSSI, P.; BECK, C.; FISCHER, H.-M.; HENNECKE, H. *Bradyrhizobium japonicum* possesses two discrete sets of electron transfer flavoprotein genes: *fixA*, *fixB* and *etfS*, *etfL*. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 169–178, 1996.
- WELSH, A.; CHEE-SANFORD, J. C.; CONNOR, L. M.; LÖFFLER, F. E.; SANFORD, R. A. Refined NrfA phylogeny improves PCR-based *nrfA* gene detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2110–2119, 2014.
- WIIG, J. A.; HU, Y.; RIBBE, M. W. NifEN-B complex of *Azotobacter vinelandii* is fully functional in nitrogenase FeMo cofactor assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 21, p. 8623–8627, 2011.
- WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **Biotechniques**, v. 22, n. 3, p. 474–481, 1997.
- von WIRÉN, N.; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants. In: **Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 95–120.
- WISEDCHASRI, G.; DRANOW, D. M.; LIE, T. J.; BONANNO, J. B.; PATSKOVSKY, Y.; OZYURT, S. A.; SAUDER, J. M.; ALMO, S. C.; WASSERMAN, S. R.; BURLEY, S. K.; LEIGH, J. A.; GONEN, T. Structural underpinnings of nitrogen regulation by the prototypical nitrogen-responsive transcriptional factor NrpR. **Structure**, v. 18, n. 11, p. 1512–1521, 2010.
- WOLFE, A. J. The acetate switch. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 12–50, 2005.
- WOOLFOLK, C. A.; STADTMAN, E. R. Regulation of glutamine synthetase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 118, n. 3, p. 736–755, 1967.

WOOTTON, J. C.; DRUMMOND, M. H. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 2, n. 7, 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. **Microbiology**, v. 152, n. 12, p. 3535–3542, 2006.

YAMASHITA, M. M.; ALMASSY, R. J.; JANSON, C. A.; EISENBERG, D. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17681–17690, 1989.

YAMAMOTO, Y.; CHUJOU, R. Iron–histidine bonding interaction in deoxymyoglobin and deoxyhaemoglobin. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 2, p. 87–89, 1992.

YANG, X.; REN, Z.; KUK, J.; MOFFAT, K. Temperature-scan cryocrystallography reveals reaction intermediates in bacteriophytochrome. **Nature**, v. 479, n. 7373, p. 428–432, 2011.

YANG, Z.-Y.; LEDBETTER, R.; SHAW, S.; PENCE, N.; TOKMINA-LUKASZEWSKA, M.; EILERS, B.; GUO, Q.; POKHREL, N.; CASH, V. L.; DEAN, D. R.; ANTONY, E.; BOTHNER, B.; PETERS, J. W.; SEEFELDT, L. C. Evidence that the Pi release event is the rate-limiting step in the nitrogenase catalytic cycle. **Biochemistry**, v. 55, n. 26, p. 3625–3635, 2016.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, v. 33, p. 103–109, 1985.

YOSHIZAWA, J. M.; BLANK, M. A.; FAY, A. W.; LEE, C. C.; WIIG, J. A.; HU, Y.; HODGSON, K. O.; HEDMAN, B.; RIBBE, M. W. Optimization of FeMoco maturation on NifEN. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 26, p. 9321–9325, 2009.

YUAN, J.; DOUCETTE, C. D.; FOWLER, W. U.; FENG, X.-J.; PIAZZA, M.; RABITZ, H. A.; WINGREEN, N. S.; RABINOWITZ, J. D. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 302, s/ p., 2009.

YUVANIYAMA, P.; AGAR, J. N.; CASH, V. L.; JOHNSON, M. K.; DEAN, D. R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 2, p. 599–604, 2000.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539–554, 2003.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4143–4149, 1996.

ZHANG, Y.; MORAR, M.; EALICK, S. E. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 23, p. 3699–3724, 2008.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; SERATE, J.; CONRAD, M. C.; ROBERTS, G. P. mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 11, p. 2711–2721, 2010.

ZHANG, Y.; POHLMANN, 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*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 4, p. 983–992, 2000.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6159–6168, 2001.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2782–2787, 2004.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 4, p. 1254–1265, 2005.

ZHANG, N.; BUCK, M. A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 1012–1019, 2015.

ZHENG, L.; WHITE, R. H.; CASH, V. L.; JACK, R. F.; DEAN, D. R. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 7, p. 2754–2758, 1993

ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNECHE, S.; WINKLER, F. K.; LI, X.-D. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17090–17095, 2004.

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

ZHU, Y.; CONRAD, M. C.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G. P. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB Variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signals. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 1866–1874, 2006.

ZIGA, E. D.; DRULEY, T.; BURNHAM, C.-A. D. *Herbaspirillum* species bacteremia in a pediatric oncology patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4320–4321, 2010.

ZIMMER, D. P.; SOUPENE, E.; LEE, H. L.; WENDISCH, V. F.; KHODURSKY, A. B.; PETER, B. J.; BENDER, R. A.; KUSTU, S. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14674–14679, 2000.

ZOU, X.; ZHU, Y.; POHLMANN, E. L.; 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.

APÊNDICE 1 – ALINHAMENTO DE NifAs

Alinhamento das seqüências de 55 proteínas NifA recuperadas do banco de dados do KEGG e de *Azospirillum brasilense* FP2 (ver seções 4.6.3, p. 84, e 5.2.6.2, p. 131). Alguns organismos (*A. vinelandii*, *R. capsulatus*) possuem mais de um parálogo de NifA, e contribuíram com mais de uma seqüência para o alinhamento. Os números acima das seqüências indicam a posição dos resíduos no alinhamento final; os números à esquerda e à direita indicam a posição do primeiro e último resíduo da linha de texto, respectivamente, na proteína NifA do organismo. *Conservation* refere-se ao grau de conservação de uma determinada posição, *Consensus* é a seqüência consenso do alinhamento (mostrada como seqüência, histograma, e logo), e *Occupancy* é a porcentagem de seqüências em que cada posição é ocupada por um resíduo (e não por um *gap*). A cor dos resíduos vem da paleta Taylor ajustada para um conservation threshold de 20%. Figura gerada com o programa Jalview 2.10 e ligeiramente editada no programa Paint.

		10	20	30	40	50
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	1	-----	-----	-----	-----	MAT 3
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	1	-----	-----	-----	-----	MPG 3
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	1	-----	-----	-----	-----	MPG 3
<i>Azospirillum</i> _sp._B510/1-642	1	-----	-----	-----	-----	MPSA 4
<i>Azospirillum lipoferum</i> /1-633	1	-----	-----	-----	-----	MPSA 4
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	1	-----	-----	-----	-----	MPDTAVAGPLFRLP 14
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	1	-----	-----	-----	-----	MEPSEVA 7
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	1	-----	-----	-----	-----	MIDIRDLVPQPGARHR 17
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2)/1-580	1	-----	-----	-----	-----	MTDQGSRPASPRRR 14
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	1	-----	-----	-----	-----	MIPESDPDT 9
<i>Azotobacter vinelandii</i> _Dj_(nifA1)/1-523	1	-----	-----	-----	-----	MNATIPQRSACK 11
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	1	-----	-----	-----	-----	MIHKSDSDT 9
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	1	-----	-----	-----	-----	MNATFAERAVA 11
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A1501/1-522	1	-----	-----	-----	-----	MNATFAERPASA 11
<i>Azotobacter vinelandii</i> _Dj_(nifA2)/1-486		-----	-----	-----	-----	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2)/1-486		-----	-----	-----	-----	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2)/1-486		-----	-----	-----	-----	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1)/1-523	1	-----	-----	-----	-----	MNATIPQRSACK 11
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1)/1-523	1	-----	-----	-----	-----	MNATIPQRSACK 11
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544		-----	-----	-----	-----	
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	1	-----	-----	-----	-----	MP 2
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	1	-----	-----	-----	-----	ML 2
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	1	-----	-----	-----	-----	MP 2
<i>Burkholderia</i> _sp._KJ006/1-572	1	-----	-----	-----	-----	MP 2
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	1	-----	-----	-----	-----	MP 2
<i>Azoarcus</i> _sp._BH72/1-518	1	-----	-----	-----	-----	MSAAGPMPAA 10
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA1)/1-553	1	-----	-----	-----	-----	MTQA 4
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA2)/1-544	1	-----	-----	-----	-----	MS 2
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_303099/1-584	1	-----	-----	-----	-----	MLPDQVGGEIVSRNTPPEPA 19
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _1021/1-542		-----	-----	-----	-----	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM1/1-542		-----	-----	-----	-----	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm41/1-542		-----	-----	-----	-----	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542		-----	-----	-----	-----	
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542		-----	-----	-----	-----	
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	1	-----	-----	-----	-----	VQAQALDNVSKAAFSRREPRVRTTLKYVPRKNMMLDECMTLS 43
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	1	-----	-----	-----	-----	MTLS 5
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	1	-----	-----	-----	-----	VQSQALDNVSKAAFSRREPRVRTTLRVFPRKNMMLDECMTLS 43
<i>Rhizobium etli</i> _CIAT_652/1-563		-----	-----	-----	-----	
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586	1	-----	-----	-----	-----	MTHMPARSADGVESLSALP 19
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576	1	-----	-----	-----	-----	MANVLRNRADVEVEQLPKL 18
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_3841/1-520		-----	-----	-----	-----	
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	1	-----	-----	-----	-----	MTRILRDCYDEVGPLPOV 18
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	1	-----	-----	-----	-----	MQNEPRQSGHGSREDDQNGDRLMLHIPSSSERPASQPEPERA 43
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	1	-----	-----	-----	-----	MLHIPSSSERPASQPEPERA 20
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._ORS_278/1-580	1	-----	-----	-----	-----	MVQTEETRQVEAQDIRSH 17
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._BTAi1/1-581	1	-----	-----	-----	-----	MVQTEETRQVEAQDVRSN 17
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	1	-----	-----	-----	-----	MAGREIRLVNEYPSPSMT 19
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	1	-----	-----	-----	-----	MAGREVRLVSEEQSRQPMN 19
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	1	-----	-----	-----	-----	MVYRDANLAEQPGERS 16
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	1	-----	-----	-----	-----	MPMTDAFQVRVPRVSSSTAGDI AASSITTRGALPRPGMPVS 42
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	1	-----	-----	-----	-----	MDTSAARSGA 10
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	1	-----	-----	-----	-----	MDTSAARSGA 10
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	1	-----	-----	-----	-----	MDISAEGSDA 10
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAI_5_(Brazil)/	1	-----	-----	-----	-----	MPDTPVFPVPVSG 13
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	1	LVLH	DA	RN	PL	LLKNADPRVRPRGGPASPRRTKESPVMPDTSHGGHTPRPS 50
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1)/1-507		-----	-----	-----	-----	
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	1	-----	-----	-----	-----	MSTD 4

Conservation

----- 00

Consensus

LVLHDA RVQ+QALDNVS+++FSRREPR+RTMLMV++RDRNAT+P+++MA

Occupancy

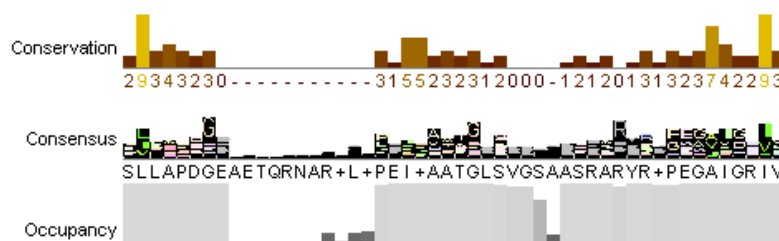


(ver legenda na página 203)

	60	70	80	90	100
<i>Herbaspirillum_seropedicae_SmR1</i> /1-543	4	ILDDRSVNLELVTIYEISKILGS	-SLDLSKTLREVLNVLSAHLETKRVL	52	
<i>Azospirillum_brasilense_Sp7</i> /1-625	4	AMRQSTSNLELLTIYEVSILGS	-SLDLQQTTLREVLRALAYQLQMRHGRV	52	
<i>Azospirillum_brasilense_FP2</i> /1-626	4	AMRQSTSNLELLTIYEVSILGS	-SLDLQQTTLREVLRALAYQLQMRHGRV	52	
<i>Azospirillum_sp_B510</i> /1-642	5	AHSASSSSLELLTIYEVSILGS	-SLDLQQTTLREVLRALAYQLQMRHGRV	53	
<i>Azospirillum_lipoferum</i> /1-633	5	AGSASSSSLELLTIYEVSILGS	-SLDLQQTTLREVLRALAYQLQMRHGRV	53	
<i>Rhodospirillum_rubrum_F11</i> /1-601	15	PSPAEDSSLPLLTLYEVSILGS	-TLDLEHSLHDVNLVLSYMQMRHGRV	63	
<i>Rhodospirillum_centenum</i> /1-558	8	RRQNKRDVRALTGLYEISKILSS	-SLNMEAACRDVLRILFWFLERFRGAV	56	
<i>Rhodobacter_capsulatus</i> /1-583	18	SARATADRLALDLYEIAKTFAA	-APDPVAEVPQIFNVLSFLDLRHGV	66	
<i>Rhodobacter_capsulatus</i> (2)/1-580	15	STQS IADRLALDLYEIAKTFAA	-APDPVAEVPQIFNVLSFLDLRHGV	63	
<i>Klebsiella_pneumoniae_342</i> /1-525	10	TVRRFDLSQQFTAMQRI SVVLSR	-ATEASKTLQEVLSVHNDAFMQHGM	58	
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ</i> (nifA1)/1-523	12	QNPVELYDLQLQALAS IARTLSR	-EQQIDELLEQVLAVLHNDLGLLHGLV	60	
<i>Klebsiella_michiganensis_E718</i> /1-525	10	TVRRFDLSQQFTAMQRI SVVLSR	-ATEASKTLQEVLSVHNDAFMQHGM	58	
<i>Pseudomonas_stutzeri_DSM_4166</i> /1-522	12	PTRELLDLCQLQALAQ IARILNR	-GRPIEELLAEILAVLHEDLGLLHGLV	60	
<i>Pseudomonas_stutzeri_A1501</i> /1-522	12	PTRELLDLCQLQALAQ IARILNR	-GRPIEELLAEILAVLHEDLGLLHGLV	60	
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ</i> (nifA2)/1-486	1	-----LRR	-TRQAKEAVAQVLA I LHDYLGLLHGLV	29	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA</i> (nifA2)/1-486	1	-----LRR	-TRQAKEAVAQVLA I LHDYLGLLHGLV	29	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6</i> (nifA2)/1-486	1	-----LRR	-TRQAKEAVAQVLA I LHDYLGLLHGLV	29	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA</i> (nifA1)/1-523	12	QNPVELYDLQLQALAS IARTLSR	-EQQIDELLEQVLAVLHNDLGLLHGLV	60	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6</i> (nifA1)/1-523	12	QNPVELYDLQLQALAS IARTLSR	-EQQIDELLEQVLAVLHNDLGLLHGLV	60	
<i>Cupriavidus_taiwanensis</i> /1-544	1	--MPHFYANDFDLVYEVVQTLVS	-SRDAEQTLDRSLRHLSSALQARSFAI	47	
<i>Burkholderia_vietnamiensis_G4</i> /1-570	3	NSHASEHRRDLVVYEVGKTLIS	-SLDVSQTLTSLRYLSYTLGARSFAV	51	
<i>Paraburkholderia_xenovorans_LB400</i> /1-573	3	NIQATVARQALDSVYEVSKTLVS	-SLDVAKTFRESLNYLHMTMARRAFV	51	
<i>Burkholderia_phymatum</i> /1-548	3	HFHLNDSLDPFDVVYEVVKTLYS	-SRDAERTLDKSLRYLSYALQARSFAI	51	
<i>Burkholderia_sp_KJ006</i> /1-572	3	NSHASEHRRDLVVYEVGKTLIS	-SLDVSQTLTSLRYLSYTLGARSFAV	51	
<i>Paraburkholderia_phenoliruptrix</i> /1-548	3	HFHLNDSLDPFDVVYEVVKTLYS	-SRDAERTLDKSLRYLSYALQARSFAI	51	
<i>Azoarcus_sp_BH72</i> /1-518	11	EERVAMLEATLEALYRVSRVLSR	-SLELRETLSVLRVLDDEECGFNRALV	59	
<i>Azoarcus_sp_KH32C</i> (nifA1)/1-553	5	QNYRRSSIDLTTIYEISKVLT	-SLDFRQSLQTVLQLLSGLNMRHALV	53	
<i>Azoarcus_sp_KH32C</i> (nifA2)/1-544	3	KTPVRNEHLQVLT IYEISKILGE	-PLELPKMLRKILNVFAIYFETRGQTI	51	
<i>Mesorhizobium_japonicum_MAFF_303099</i> /1-584	20	VEAARNADSLGGIYEISKILTA	-PTRLEITLANVANI LSSFVQMRHGA I	68	
<i>Sinorhizobium_meliloti_1021</i> /1-542	1	---MRKQDKRSAE IYSISKALMA	-PTRLETTLN NFVNTLSLILRMRROGL	46	
<i>Sinorhizobium_meliloti_SM11</i> /1-542	1	---MRKQDKRSAE IYSISKALMA	-PTRLETTLN NFVNTLSLILRMRROGL	46	
<i>Sinorhizobium_meliloti_Rm41</i> /1-542	1	---MRKQDKRSAE IYSISKALMA	-PTRLETTLN NFVNTLSLILRMRROGL	46	
<i>Sinorhizobium_meliloti_2011</i> /1-542	1	---MRKQDKRSAE IYSISKALMA	-PTRLETTLN NFVNTLSLILRMRROGL	46	
<i>Sinorhizobium_medicale</i> /1-542	1	---MRKQDKRSAE IYSISKALIA	-PTRLDITLN NFVNTLSVLRMRROGL	46	
<i>Sinorhizobium_fredii_NGR234</i> /1-595	44	PKTMHKRDLGCSGLYRISKVLT	-SASLEIKLANVINTLPALLPMRRGA I	92	
<i>Sinorhizobium_fredii_HH103</i> /1-557	6	PKTMHKRDLGCSGLYRISKVLT	-SASLEIKLANVINTLPALLPMRRGA I	54	
<i>Sinorhizobium_fredii_USDA_257</i> /1-595	44	PKTMHKRDLGCSGLYRISKVLT	-SASLEIKLANVINTLPALLPMRRGA I	92	
<i>Rhizobium_etli_CIA1</i> 652/1-563	1	---MRQAGTQRSGIYEISKVLT	-PARLEITLANVNVNLSFLQIRCGAI	46	
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1</i> (nifA1)/1-586	20	AEPVRQAGTQLSGIYEISKVLT	-PARLEIKLANVNVNLSFLQMRHGA I	68	
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1</i> (nifA2)/1-576	19	SSNMPKTELLLRGIYRVSKLLTA	-PIPLETTLADVAKALPSFVRIRSGAI	67	
<i>Rhizobium_leguminosarum_bv_viciae_3841</i> /1-520	1	---MIKPEARLHILYDISKELIS	-SFPLDNVLKAAAMNLAELRLRDGGI	46	
<i>Rhizobium_tropicum</i> /1-583	1	---MRKQDKRSAE IYSISKLLTA	-AAPLEITLVKVANI LPTFLRMRHGA I	67	
<i>Bradyrhizobium_diazoeficiens_USDA_110</i> /1-606	44	PPGEPShESALAGIYEISKILNA	-PGRLEVTLANVNLGSLQSFVQMRHGLV	92	
<i>Bradyrhizobium_japonicum_USDA_6</i> /1-583	21	PPGEPShESALAGIYEISKILNA	-PGRLEVTLANVNLGSLQSFVQMRHGLV	69	
<i>Bradyrhizobium_sp_ORS_278</i> /1-580	18	AAPILPSEIALTGIFEISKILAA	-PTRLEITLANVNVNLSQSFQMRHGV	66	
<i>Bradyrhizobium_sp_BTAl1</i> /1-581	18	AAPILPSEIALTGIFEISKILAA	-PTRLEITLANVNVNLSQSFQMRHGV	66	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_CGA009</i> /1-585	20	HPIPLSDIALTGIFEISKILTS	-PARLEITLANVNVNLSQSFQMRHGV	68	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_HaA2</i> /1-584	20	QNPILPSEIALTGIFEISKILTA	-PARLEVTLANVNVNLSQSFQMRHGV	68	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_BisA53</i> /1-577	17	IAPILPSEIALTGIFEISKILTA	-PARLEITLANVNVNLSQSFQMRHGT	65	
<i>Azorhizobium_caulinodans</i> /1-616	43	MSRGTSPEVALIGVYEISKILTA	-PRRLEVTLANVNVNLSMLQMRHGM	91	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_2.4.1</i> /1-582	11	VAERGEYLTLDALCEIAKLLTG	-ASDPIACMPAVFGVLGAFMGLRHGA I	59	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17029</i> /1-582	11	VAERGEYLTLDALCEIAKLLTG	-ASDPIACMPAVFGVLGAFMGLRHGA I	59	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17025</i> /1-583	11	AAERGEYLTLDALCEIAKLLTG	-ASDPIAHMPAVFGVLGAFMGLKHGA I	59	
<i>Gluconacetobacter_diazotrophicus_PA1_5</i> (Brazil)	14	EGHSTWAERALFGLHEISKILCA	-PTEVTGIRNVLALESFVDLNNVAV	62	
<i>Pararhodospirillum_photometricum</i> /1-604	51	SGGGADGSLALITMYEISKILGS	-TLNLSRLRDVNLISSYLQMRHGV	99	
<i>Aquifex_aeolicus</i> (Nih1)/1-507	1	---MDLKVEIETLYEVSILSS	-SLNLETTVPYIFRLKLMGFERLTL	45	
<i>Hydrogenobacter_thermophilus</i> /1-522	5	ETLKKFMRTEINLLYNLSKRFVR	-VETHPEQLILDVVRMLSDIEGIERIAF	54	

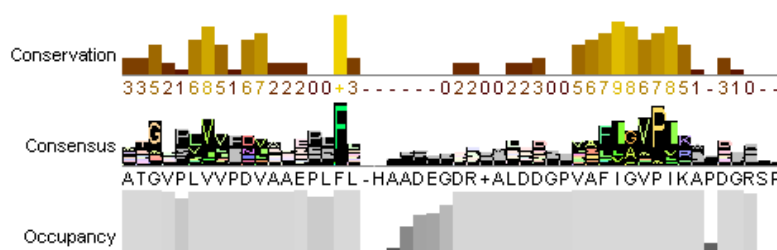


		110	120	130	140	150
<i>Herbaspirillum_seropedicae_SmR1/1-543</i>	53	SLMQDSGE	-----LQLVSAIGLSYEE	-FQSGRYRVGEGITGKIF		90
<i>Azospirillum_brasilense_Sp7/1-625</i>	53	YLVGEDNV	-----LRLVAANGLSNEAAQIE	-FRDGEGITGRIL		90
<i>Azospirillum_brasilense_FP2/1-626</i>	53	YLVGEDNV	-----LRLVAANGLSNEAAQIE	-FRDGEGITGRIL		90
<i>Azospirillum_sp_B510/1-642</i>	54	YLQGEDGA	-----LRLVAAQGLPKGSPA	IDYNQGGEGISGRIL		92
<i>Azospirillum_lipoferum/1-633</i>	54	YLQGEDNA	-----LRLVAALGLPKDSTAGE	IDYSQGGEGISGRIL		92
<i>Rhodospirillum_rubrum_F11/1-601</i>	64	TLKDAQRQ	-----LEVVAVSGMTLRN	-AVEGEARYPLAVAQEVV		101
<i>Rhodospirillum_centenum/1-558</i>	57	ILRQDLGD	-----YRVAAGICIS	-----EGRTNLEPPREVLDAVV		90
<i>Rhodobacter_capsulatus/1-583</i>	67	ALLAEPGE	-----GAGVNPYVIAATAFQRSP	-EAPAADVLPAVARIVF		109
<i>Rhodobacter_capsulatus(2Y1-580</i>	64	ALLAEPGE	-----GAGVNPYVIAATAFQRSP	-EAPAADVLPAVARIVF		106
<i>Klebsiella_pneumoniae_342/1-525</i>	59	CLYDSEGE	-----I-LSIEALQQTGGQPLPGSTQIRYR	PGEGLVGTVL		100
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ_(nifA1Y1-523</i>	61	TISDPEHG	-----A-LQIGAHTDSEAVAQACEGVYRS	GEGVIGNVL		102
<i>Klebsiella_michiganensis_E718/1-525</i>	59	CLYDSQGE	-----I-LSIEALQQTENQTLPGSTQIRYR	PGEGLVGTVL		100
<i>Pseudomonas_stutzeri_DSM_4166/1-522</i>	61	SICDPKNG	-----T-LQVGAVHTDSEAVVRACESTRYR	IGEGVFGNIL		102
<i>Pseudomonas_stutzeri_A1501/1-522</i>	61	SICNPKDG	-----S-LQVGAVHSDSETVVRACESTRYR	IGEGVFGNIL		102
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ_(nifA2Y1-486</i>	30	SIIAAPQP	-----RMLRVVAIHTSSRLVAKAAEEVRYRR	GEGVMGHVL		72
<i>Azotobacter_vinelandii_CA_(nifA2Y1-486</i>	30	SIIAAPQP	-----RMLRVVAIHTSSRLVAKAAEEVRYRR	GEGVMGHVL		72
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6_(nifA2Y1-486</i>	30	SIIAAPQP	-----RMLRVVAIHTSSRLVAKAAEEVRYRR	GEGVMGHVL		72
<i>Azotobacter_vinelandii_CA_(nifA1Y1-523</i>	61	TISDPEHG	-----A-LQIGAHTDSEAVAQACEGVYRS	GEGVIGNVL		102
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6_(nifA1Y1-523</i>	61	TISDPEHG	-----A-LQIGAHTDSEAVAQACEGVYRS	GEGVIGNVL		102
<i>Cupriavidus_taiwanensis/1-544</i>	48	AVAEPGGY	-----LAGFCSTGLSEGW	-RERVRFPLDEGVVGR		85
<i>Burkholderia_vietnamiensis_G4/1-570</i>	52	VVVEPDGY	-----LRGLCCTGLADDW	-RQVRVFLPGEGIVGR		89
<i>Paraburkholderia_xenovorans_LB400/1-573</i>	52	VLAEPDGG	-----LRGLCAAGLSRDE	-QQRLQFRPGEIVGRA		89
<i>Paraburkholderia_phymatum/1-548</i>	52	AVTEPDGH	-----LCSLCSTGLSEGW	-RDRARFLSGEGIVGR		89
<i>Burkholderia_sp_KJ006/1-572</i>	52	VVVEPDGY	-----LRGLCCTGLADDW	-RQVRVFLPGEGIVGR		89
<i>Paraburkholderia_phenoliruptrix/1-548</i>	52	AVTEPDGH	-----LCSLCSTGLSEGW	-RDRARFLSGEGIVGR		89
<i>Azoarcus_sp_BH72/1-518</i>	60	TLNEPDGE	-----SMAISALHGVDAPI	-DPDIRARSGEGVIGSTQ		98
<i>Azoarcus_sp_KH32C_(nifA1Y1-553</i>	54	GLVQTDGQ	-----LHILGAAGVPWPM	-SEAPILDPREGIISKVI		91
<i>Azoarcus_sp_KH32C_(nifA2Y1-544</i>	52	SLVHESGE	-----LHLVGASGMSGDE	-FRKCRECVGDGLPGR		89
<i>Mesorhizobium_japonicum_MAFF_303099/1-584</i>	69	VVLDAEGE	-----PQISATTGGAVP	-QSAIGSVIPQAVIDKIV		105
<i>Sinorhizobium_meliloti_1021/1-542</i>	47	EIPASEGE	-----TKITAAATRNSSGS	-PSAADYTPVKAADQVM		83
<i>Sinorhizobium_meliloti_SM1/1-542</i>	47	EIPASEGE	-----KKITAAATRNSSGS	-PSAADYTPVKAADQVM		83
<i>Sinorhizobium_meliloti_Rm41/1-542</i>	47	EIPASEGE	-----KKITAAATRNSSGS	-PSAADYTPVKAADQVM		83
<i>Sinorhizobium_meliloti_2011/1-542</i>	47	EIPASEGE	-----TKITAAATRNSSGS	-PSAADYTPVKAADQVM		83
<i>Sinorhizobium_medicae/1-542</i>	47	EIPASEGE	-----AKITAAATRNSSGS	-PSAADYTPVKAADQVI		83
<i>Sinorhizobium_fredii_NGR234/1-595</i>	93	VVVGAEGE	-----PETTATFGVEPP	-SSGARHIAAKAIDRIV		129
<i>Sinorhizobium_fredii_HH103/1-557</i>	55	VVVGAEGE	-----PETTATFGVEPP	-SSGARHIAAKAIDRIV		91
<i>Sinorhizobium_fredii_USDA_257/1-595</i>	93	VVVGAEGE	-----PETTATFGVEPP	-SSGARHIAAKAIDRIV		129
<i>Rhizobium_etli_CIA7_652/1-563</i>	47	VVLDAEGQ	-----PEIAATGDI PPSS	-QSAARGVIPKAVIDHIA		84
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1_(nifA1Y1-586</i>	69	VVLDAEGQ	-----PEIAATGDI PPAS	-PSAARGVIPKAIDHIV		106
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1_(nifA2Y1-576</i>	68	IVLTAGEE	-----PEFIASAGSDPH	-LARAENV	-RLAIEKIV	103
<i>Rhizobium_leguminosarum_bv_viciae_3841/1-520</i>	47	VIHSGSGE	-----PWIVNRAPIGHDV	-RSRSLTIEQADTINRVI		84
<i>Rhizobium_tropic/1-583</i>	68	VIWASEGE	-----PEITASAGVADSR	-QSGARHTIPPAAMDQIV		105
<i>Bradyrhizobium_diazoefficiens_USDA_110/1-606</i>	93	SLFNDDGV	-----PELTVGAGASEGT	-DERYRTCVPQKAIHEIV		130
<i>Bradyrhizobium_japonicum_USDA_6/1-583</i>	70	SLFNDDGV	-----PELTVGAGASEGT	-DERYRTCVPQKAIHEIV		107
<i>Bradyrhizobium_sp_OR5_278/1-580</i>	67	SLLADDGI	-----PD LAVGAGASEGS	-DQRYRERLPQKAIHQIV		104
<i>Bradyrhizobium_sp_BTAI1/1-581</i>	67	SLLADDGI	-----PD LAVGAGASEGS	-DQRYRERLPQKAIHQIV		104
<i>Rhodopseudomonas_palustris_CGA009/1-585</i>	69	SLLADDGV	-----PDITVGVGANECS	-DNRYRARLPQKAIHQIV		106
<i>Rhodopseudomonas_palustris_HaA2/1-584</i>	69	SLLADDSV	-----PDITVGVGANECS	-DNRYRARLPQKAIHQIV		106
<i>Rhodopseudomonas_palustris_BisA53/1-577</i>	66	SLLADDGV	-----PDITVGVGANECS	-DQRYRARLPQKAIHQIV		103
<i>Azorhizobium_caulinodans/1-616</i>	92	CILDSEGD	-----PDMVATTGATPEM	-AGQIRAHVPQKAIHQIV		129
<i>Rhodobacter_sphaeroides_2.4.1/1-582</i>	60	ALLQEGAQAETQRNARHYNPYVIAATASGVPP	-AGAEARAIPAQVARHVF			108
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17029/1-582</i>	60	ALLQEGAQAETQRNARHYNPYVIAATASGVPP	-AGAEARAIPAQVARHVF			108
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17025/1-583</i>	60	ALLQEGAPGESSRNARHINPYVVAATASGGP	-VSADCRIPAQAARHVF			107
<i>Gluconacetobacter_diazotrophicus_PA1_5_(Brazil)</i>	63	ALFDAAGN	-----VETIIGTEADDAA	-ARRYFDSIEQAVGGIA		100
<i>Pararhodospirillum_photometricum/1-604</i>	100	TLSDDAGL	-----LEVVAVTGMSLTG	-AREGEACFPLEAMAEVT		137
<i>Aquifex_aeolicus_(Nih1Y1-507</i>	46	TIYDPSTD	-----QIVVYRATSSGK	-FPKEGFKKGEGITGKVV		81
<i>Hydrogenobacter_thermophilus/1-522</i>	55	YVAESDQS	-----KISLVSSVGVE	-----EKSIRLSKREGVVGIF		90



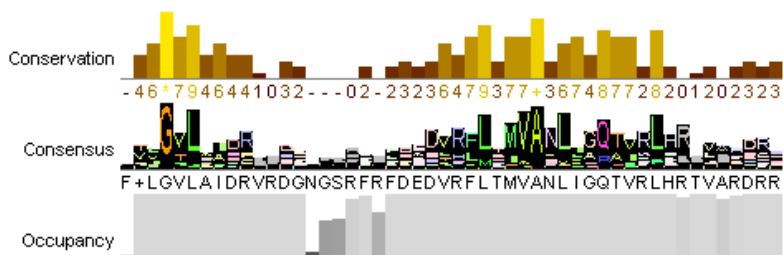
(ver legenda na página 203)

		160	170	180	190	200																																					
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	91	QTETP	IIVVRDLAQEPL	FL	---	ARTSPRQSGDGEV	ISFVGVP	IKA	-ARE	--	134																																
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	91	KTGMP	AVVPNLAEEPL	FL	---	NRTGGREDLDEQVAS	LVGVP	IKAAGV	---	134																																	
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	91	KTGMP	AVVPNLAEEPL	FL	---	NRTGGREDLDEQVAS	LVGVP	IKAAGV	---	134																																	
<i>Azospirillum</i> _sp_B510/1-642	93	KTGMP	AVVPNLAEEPL	FN	---	NRSGGRDDLDEQVAS	LVGVP	IKA	-AGA	--	136																																
<i>Azospirillum lipoferrum</i> /1-633	93	KTGMP	AVVPNLAEEPL	FN	---	NRSGGRDDLDEQVAS	LVGVP	IKA	-AGT	--	136																																
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	102	STAMP	MI	VPSMAADPR	FA	---	AFAAEADGLDDEVQSM	ICVPI	KG	-GVK	--	145																															
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	91	AHGMP	LV	IAD	ILNDPL	FD	-----	GLVPSGTAGQVAL	VAAPI	RG	-NGA	--	131																														
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	110	RSQVP	PFVS	FDLAAE	--	FG	---	AEAVPKRLRDAGQTL	I	AVPLRD	-	PERSH	152																														
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2Y1-580	107	RSQVP	PFVS	FDLAAE	--	FG	---	AEAVPKRLRDAGQTL	I	AVPLRD	-	PERSH	149																														
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	101	AQQQS	LVL	PRVADDQR	FL	-----	DRLSLYDYDLPF	I	AVPL	LMGPNAR	--	141																															
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA1Y1-523	103	KHGNS	VVLGR	I	SADPR	FL	-----	DRLALYDLEMPF	I	AVP	I	KNPEGN	--	143																													
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	101	AQQQS	LVL	PRVADDQR	FL	-----	DRLSLYDYDLPF	I	AVPL	LMGPHSR	--	141																															
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	103	KHGNS	VVLGR	I	DAEPR	FL	-----	DRLALYDMDLPF	I	AVP	I	KA	VDGT	--	143																												
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A150/1-522	103	KHGNS	VVLGR	I	DAEPR	FL	-----	DRLALYDMDLPF	I	AVP	I	KA	VDGT	--	143																												
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA2Y1-486	73	EHSES	VMLER	VSLAPR	FL	-----	DRLALYDPESPF	I	AVP	I	KG	PEDD	--	113																													
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2Y1-486	73	EHSES	VMLER	VSLAPR	FL	-----	DRLALYDPESPF	I	AVP	I	KG	PEDD	--	113																													
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2Y1-486	73	EHSES	VMLER	VSLAPR	FL	-----	DRLALYDPESPF	I	AVP	I	KG	PEDD	--	113																													
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1Y1-523	103	KHGNS	VVLGR	I	SADPR	FL	-----	DRLALYDLEMPF	I	AVP	I	KNPEGN	--	143																													
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1Y1-523	103	KHGNS	VVLGR	I	SADPR	FL	-----	DRLALYDLEMPF	I	AVP	I	KNPEGN	--	143																													
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	86	SSDSP	I	IVPE	I	HDEHFLA	---	DRFGTANELDGDH	I	ALL	GTP	IRH	-EGR	--	129																												
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	90	TSGSP	IV	PEVR	DE	PL	FL	---	DRTGGAGEPDDGS	VAM	L	GMP	IRH	-EGR	--	133																											
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	90	KSGI	GV	IV	PO	VND	EP	FL	---	NRTGGADQMPGAC	I	AM	LAT	IRH	-DRE	--	133																										
<i>Paraburkholderia phytatum</i> /1-548	90	SSDA	AVV	PEL	N	EEPL	FA	---	DDIGAVGGEHVAL	L	GTP	IRH	-EGR	--	133																												
<i>Burkholderia</i> _sp_KJ006/1-572	90	TSGSP	IV	PEVR	DE	PL	FL	---	DRTGGAGEPDDGS	VAM	L	GMP	IRH	-EGR	--	133																											
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	90	SSDA	AVV	PEL	N	EEPL	FA	---	DDIGAVGGEHVAL	L	GTP	IRH	-EGR	--	133																												
<i>Azoarcus</i> _sp_BH72/1-518	99	QRSR	PLV	VAR	L	ADPN	FL	-----	SRRGLFDGEAPF	I	GAP	I	RA	-GHE	--	138																											
<i>Azoarcus</i> _sp_KH32C_(nifA1Y1-553	92	RSQSP	I	VPD	I	AGDA	HT	---	NRTGRDPEQMKG	VSYL	VV	PLK	V	-DRE	--	134																											
<i>Azoarcus</i> _sp_KH32C_(nifA2Y1-544	90	KTGMP	I	VPD	I	TKEP	QFQ	-HCQGT	VE	ESH	GRR	VAY	I	GV	I	KT	-GRE	--	135																								
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_303099/1-584	106	ATGVP	I	VPD	I	QD	T	STSEL	FQ	----	ADPQSTSGT	I	A	TAF	I	GV	PLKA	-EEK	--	147																							
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _1021/1-542	84	TAGR	-	LV	VPD	V	CNSEL	FK	----	DQIKWRG	I	G	TAF	I	AA	AEV	-DHE	--	123																								
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM11/1-542	84	TAGR	-	LV	VPD	V	CNSEL	FK	----	DEIKWRG	I	G	TAF	I	AA	AEV	-DHE	--	123																								
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm41/1-542	84	TAGR	-	LV	VPD	V	CNSEL	FK	----	DEIKWRG	I	G	TAF	I	AA	AEV	-DHE	--	123																								
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542	84	TAGR	-	LV	VPD	V	CNSEL	FK	----	DQIKWRG	I	G	TAF	I	AA	AEV	-DHE	--	123																								
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	84	TAGR	-	LV	VPD	V	CNSEL	FK	----	DQIKWHG	I	G	TAF	I	AA	AEV	-DHE	--	123																								
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	130	AKGAP	L	V	VPD	T	CRSEL	FQ	---	DELQS	I	V	S	G	T	G	L	V	T	F	I	GV	P	MKA	-DQE	--	172																
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	92	AKGAP	L	V	VPD	T	CRSEL	FQ	---	DELQS	I	V	S	G	T	G	L	V	T	F	I	GV	P	MKA	-DQE	--	134																
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	130	AKGAP	L	V	VPD	T	CRSEL	FQ	---	DELQS	I	V	S	G	T	G	L	V	T	F	I	GV	P	MKA	-DQE	--	172																
<i>Rhizobium etli</i> _CIA_T_652/1-563	85	TTGMP	L	IV	KD	V	SKSEL	FQ	---	AEPQPW	S	G	T	V	I	S	F	I	GV	P	VKA	-DNK	--	128																			
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1Y1-586	107	TTGMP	L	IV	KD	V	SKSEL	FQ	---	ADPQP	T	R	S	G	S	V	P	V	A	F	I	GV	P	VKA	-DSK	--	150																
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2Y1-576	104	TTAR	V	L	V	I	P	D	T	R	N	S	E	L	F	R	---	ANLKASPS	RDA	I	P	I	A	F	I	G	I	P	I	R	A	-GPE	--	147									
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_3841/1-520	85	ASG	-----	E	K	H	F	Q	-----	K	N	S	V	V	L	P	V	K	V	-	N	R	K	--	105																		
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	106	TTGQP	L	V	I	R	E	T	S	K	S	E	L	F	R	---	ADPQPS	L	S	S	D	T	I	P	I	T	F	I	GV	P	L	R	A	-AHK	--	149							
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	131	ATGR	S	L	M	V	E	N	V	A	A	E	T	A	F	S	---	AADRE	V	L	G	A	S	D	S	I	P	V	A	F	I	GV	P	I	R	V	-DST	--	175				
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	108	ATGR	S	L	M	V	E	N	V	A	A	E	T	A	F	S	---	AADRE	V	L	G	A	S	D	S	I	P	V	A	F	I	GV	P	I	R	V	-DST	--	152				
<i>Bradyrhizobium</i> _sp_OR5_278/1-580	105	ATAV	P	L	I	A	E	N	V	A	D	H	S	A	F	S	---	AAD	A	A	T	L	G	A	G	A	D	T	R	V	S	F	L	G	V	P	I	R	I	-DGR	--	149	
<i>Bradyrhizobium</i> _sp_BTAl/1-581	105	ATAV	P	L	I	A	E	N	V	A	D	H	S	A	F	S	---	PAD	A	V	T	L	G	A	G	A	D	T	R	V	S	F	L	G	V	P	I	R	I	-DGR	--	149	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	107	ATAV	P	L	V	A	D	N	V	S	A	H	P	M	F	T	---	AAD	A	M	A	L	G	A	T	D	E	I	R	V	S	F	I	GV	P	I	R	I	-DSR	--	151		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	107	ATS	V	P	L	V	A	D	N	V	A	A	H	P	M	F	S	---	AAD	A	L	A	L	G	A	T	D	E	T	R	V	S	F	I	GV	P	I	R	I	-DSR	--	151	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	104	ATS	V	P	L	V	E	N	V	A	A	H	P	M	F	S	---	AVD	V	A	A	L	G	A	S	E	E	T	R	V	S	F	I	GV	P	I	R	I	-DSR	--	148		
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	130	ATQ	M	P	L	V	V	Q	D	V	T	A	D	P	L	F	A	---	GH	E	D	L	F	G	P	P	E	E	A	T	V	S	F	I	GV	P	I	K	A	-DHH	--	173	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	109	RNGV	S	L	V	S	C	D	I	L	E	E	--	FG	---	AEAL	P	P	G	L	G	D	S	R	Q	A	L	V	A	V	P	I	R	D	-	Q	A	N	S	P	151		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	109	RNGV	S	L	V	S	C	D	I	L	E	E	--	FG	---	AEAL	P	P	G	L	G	D	S	R	Q	A	L	V	A	V	P	I	R	D	-	Q	A	N	S	P	151		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	108	RNGV	S	L	V	S	C	D	I	V	D	E	--	FG	---	ADAL	P	P	G	L	E	D	K	Y	Q	A	L	I	A	V	P	I	R	D	-	Q	A	N	S	P	150		
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAI_5_(Brazil)	101	VSR	Q	P	L	L	V	P	D	V	T	G	D	T	R	Y	G	---	F	A	T	S	Q	A	W	T	V	G	A	R	I	G	V	I	G	V	P	I	L	S	-RDR	--	144
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	138	GTAMP	L	I	I	Y	D	M	A	G	D	P	R	F	T	---	K	Y	A	A	Q	A	Y	T	V	E	D	D	I	G	S	L	I	A	V	P	I	K	T	-TTR	--	181	
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1Y1-507	82	KHGV	P	I	V	P	D	I	S	Q	E	P	E	F	L	---	N	K	W	K	R	K	S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	-GGK	--	124			
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	91	KQGP	V	P	V	I	K	N	L	A	E	E	P	L	FL	-----	N	K	I	K	R	A	D	L	S	D	V	N	F	I	G	V	P	I	K	Y	-EDR	--	131				



(ver legenda na página 203)

	210	220	230	240	250
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	135 -MLGVLCVFRDQGS	-PSRS -VDHEVRLT	TMVANLIGQTVRL	LYRSVAAERQ	181
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	135 -VVGVLTI DRISDE	-GPQGHFGSDVRFL	TMVANLIGQTVRL	LHRTVAEERR	182
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	135 -VVGVLTI DRISDE	-GPQGHFGSDVRFL	TMVANLIGQTVRL	LHRTVAEERR	182
<i>Azospirillum</i> _sp_B510/1-642	137 -VIGVLTIDRISDD	-GPRGHFGSDVRFL	TMVANLIGQTVRL	LHRTVAEERR	184
<i>Azospirillum lipoferum</i> /1-633	137 -VVGVLTI DRISDD	-GPSGHFGSDVRFL	TMVANLIGQTVRL	LHRTVAEERR	184
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	146 -PFGSLSI ERHRDR	-GTRFKFEHVDVRL	TMVATLIAQTVSL	LERRVVGDRD	193
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	132 -VLGVLAARETHG	---AARLDEDTRFL	SMVANLVGQSVVL	LHQKVAEDRE	177
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	153 FVLGVLAAYRSHDHNRSGF	-SDADVRLTMVASL	LEQALRFRRRI	ARDRE	201
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2)/1-580	150 FVLGVLAAYRSHDHNRSGF	-SDADVRLTMVASL	LEQALRFRRRI	ARDRE	198
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	142 -PIGVLAAGPMAHQ	---EERLPACTRFL	ETVANLVAQTI	RLM-ILPASPA	186
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA1)/1-523	144 -TIGVLAAGPDCRA	---DEHMPARTRL	LEIVANLLAQTV	RLVVNI-EDGR	188
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	142 -PIGVLAAGPMAHQ	---EERLPACTRFL	ETVANLVAQTI	RLM-ILPTSAA	186
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	144 -TIGVLAAGPDRRA	---DELMPERTRL	MEIVARLLAQTV	RLVVNI-DGQ	188
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A1501/1-522	144 -TIGVLAAGPDRRA	---DELMPERTRL	MEIVARLLAQTV	RLVVNI-EDGQ	188
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA2)/1-486	114 -TIGVLAAGPDGRK	---DVSLPERAHF	LEIVANLLSQTV	HLMAKLTGSR	159
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2)/1-486	114 -TIGVLAAGPDGRK	---DVSLPERAHF	LEIVANLLSQTV	HLMAKLTGSR	159
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2)/1-486	114 -TIGVLAAGPDGRK	---DVSLPERAHF	LEIVANLLSQTV	HLMAKLTGSR	159
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1)/1-523	144 -TIGVLAAGPDCRA	---DEHMPARTRL	LEIVANLLAQTV	RLVVNI-EDGR	188
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1)/1-523	144 -TIGVLAAGPDCRA	---DEHMPARTRL	LEIVANLLAQTV	RLVVNI-EDGR	188
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	130 -PLGVLVAFCEENRD	-GTRA-FANDLQ	LMLKVVAAAPMG	QALLLNREAMN	176
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	134 -TLGVLVAFCEENPD	-RNRV-FANDLY	LMKIVATLMGQ	AMLLHRSVSCA	180
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	134 -TLGVLVAFCEENPD	-RNRV-FANDLY	LMKIVATLMGQ	AMLLHRSVSCA	180
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	134 -PLGVLVAFCEENPD	-GKRT-FGDDLQ	LMLKIVAAAPMA	QALLLHREKAM	180
<i>Burkholderia</i> _sp_KJ006/1-572	134 -TLGVLVAFCEENPD	-RNRV-FANDLY	LMKIVATLMGQ	AMLLHRSVSCA	180
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	134 -PLGVLVAFCEENPD	-GKRT-FGDDLQ	LMLKIVAAAPMA	QALLLHREKAM	180
<i>Azoarcus</i> _sp_BH72/1-518	139 -TVGVLLAQPSPTS	---REHLDYAHF	AEMVANLVGQ	TVRLSCQVRQ	184
<i>Azoarcus</i> _sp_KH32C_(nifA1)/1-553	135 -VIGILSADRHPDD	-EESVNFERDVR	MLSLVANLLAQ	TFRLHQVAADR	182
<i>Azoarcus</i> _sp_KH32C_(nifA2)/1-544	136 -VVGVMGIERVIFN	-PSHRFEDVNL	LKMYANLIGQ	AVRLHREAGV	182
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_303099/1-584	148 -IFGTLSIDRVNRG	-TTKFRYEEDL	RFLAMVANLV	GRTRLHRTLST	195
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _102/1-542	124 -TGGMLWFCEAEE	---DYDYEEVH	FLSMAANLAG	RAIRLHRTISR	169
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM11/1-542	124 -TGGMLWFCEAEE	---DSDYEEVH	FLSMAANLAG	RAIRLHRTISR	169
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm41/1-542	124 -TGGMLWFCEAEE	---DSDYEEVH	FLSMAANLAG	RAIRLHRTISR	169
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542	124 -TGGMLWFCEAEE	---DYDYEEVH	FLSMAANLAG	RAIRLHRTISR	169
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	124 -TGGMLWFERAKES	---GYDYEEVH	LLSMAADLAG	RAIRLHRTISR	169
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	173 -TLGTLWIDRAKDG	AATRTQFEEV	RFLSMVANLA	ARAVRLDGHES	221
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	135 -TLGTLWIDRAKDG	AATRTQFEEV	RFLSMVANLA	ARAVRLDGHES	183
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	173 -TLGTLWIDRAKDG	AATRTQFEEV	RFLSMVANLA	ARAVRLDGHES	221
<i>Rhizobium etli</i> _CIAT_652/1-563	129 -ILGTISIDRVNRD	-AAPFPADED	VRLTMVANLV	SRTIRLHRLN	176
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586	151 -ILGTISIDRVRS	G-TATFSSDED	VRLTMVANLV	SGRTIRLHRLN	198
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576	148 -TVGILWIDRVRD	G---ADHDED	ISFLTMVADL	VGGTISFHRAL	192
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_384/1-520	106 -AIGALWIDFAQGS	-----GAQD	ESLLAMIAVL	IGLACQRYEL	148
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	150 -LVGTLWIDRFDS	-ATELRHNE	DIRFLTMVAD	LIGGTIAFHRAL	197
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	176 -VVGTLTIDRI	PEG-SSSL-LEYD	ARLLAMVANV	IGGTIKLHRL	222
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	153 -VVGTLTIDRI	PEG-SSSL-LEYD	ARLLAMVANV	IGGTIKLHRL	199
<i>Bradyrhizobium</i> _sp_OR5_278/1-580	150 -VVGTLTIDRW	MDG-RAVFR	LDSVRLTMVAN	LIGGTIKLHRV	197
<i>Bradyrhizobium</i> _sp_BTAl/1-581	150 -VVGTLTIDRW	MDG-RAVFR	LDSVRLTMVAN	LIGGTIKLHRV	197
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	152 -VVGTLTIDRV	RDG-RSHFR	MDADVRLTMVAN	LIGGTIKLHRV	199
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	152 -VVGTLTIDRV	RDG-QSIFRMD	ADVRLTMVAN	LIGGTIKLHRV	199
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	149 -VVGTLTIDRV	RDG-SSIFRMD	ADVRLTMVAN	LIGGTIKLHRV	196
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	174 -VMGTLSIDR	IMDG-TARFR	FDEVRFLTMVAN	LVGGTVRLHKL	221
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	152 FVLGVLCAYRSLKDN	GARY-LD	TLRLVNLNMA	AVLEQSI	200
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	152 FVLGVLCAYRSLKDN	GARY-LD	TLRLVNLNMA	AVLEQSI	200
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	151 FVLGVLCAYRSLKDN	GARY-LD	TLRLVNLNMA	AVLEQSI	199
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAI_5_(Brazil)	145 -LVGVMLLDRPA	IP-EESVVG	SMDVCLLSM	VAGLMQGMV	192
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	182 -PFGTSLIERHRD	G-TTRFGFEH	VDVRLTMV	TNLIGGTVAL	229
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1)/1-507	125 -VIGVLSADKE	INE---KDSL	DEYTRFLSM	IATLIANSFS	170
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	132 -AVGVITVDV	NKGF---VAT	ANLVDLLVM	SNLIGSYLYT	176



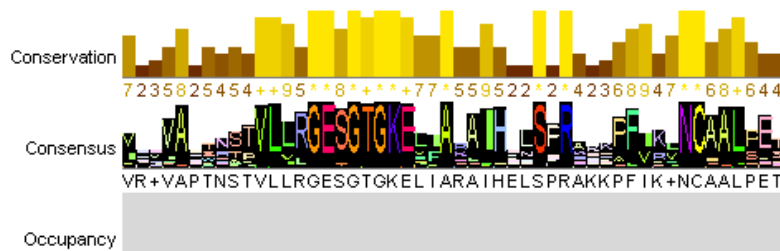
(ver legenda na página 203)

	260	270	280	290	300
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	182	QLQEEKRQLS-RQLQ-----GKYK-----LDN-VIGISKAMQEVFAQ	216		
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	183	FMMRETFRMQ-KELRP-----VAAP-----IND-VVCTSPNMLEVMAQ	218		
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	183	FMMRETFRMQ-KELR-----PVAAP-----IND-VVCTSPNMLEVMAQ	218		
<i>Azospirillum</i> _sp_B510/1-642	185	FMMRETFRVQ-KELR-----PVVAP-----VND-VVCTSPNMVDVLAQ	220		
<i>Azospirillum tipoferum</i> /1-633	185	FMMRETFRVQ-KELR-----PVVAP-----VND-VVCTSPNMVDVLAQ	220		
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	194	RLIEEKARLE-KALP-----KREKPLKGTILEN-VVGRSSAMMKISAQ	234		
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	178	RLLAEGMARLQ-KELEEQS--RRPLPLSSSP-TLNG-IIGSAPAIRAVMDR	222		
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	202	RALEDTRRML-QTVT-----EGRGPAAPVSLDG-IVGSSPAIAEVVAQ	242		
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2Y1-580	199	RALEDTRRML-QTVT-----EGRGPAAPVSLDG-IVGSSPAIAEVVAQ	239		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	187	LSSRQPPKVE-RP-----PACSSSRGVGLDN-MVGKSPAMRQIVEV	225		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA1Y1-523	189	EAADERDELRL-REVR-----GKYG-----FENMVVGHPTMRRVFDQ	224		
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	187	QPAQQSPRVE-RT-----HACTPSRFGLEN-MVGKSPAMRQIMDI	225		
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	189	EVADERDELRL-REVR-----AKYG-----FENMVVGHPTMRRVFDQ	224		
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A1501/1-522	189	EVVDERDELRL-REVR-----AKYG-----FENMVVGHPTMRRVFDQ	224		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA2Y1-486	160	TTSERDE-----PRGNVRTQHGIVENMMIGSTPSMRRVFEQ	194		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2Y1-486	160	TTSERDE-----PRGNVRTQHGIVENMMIGSTPSMRRVFEQ	194		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2Y1-486	160	TTSERDE-----PRGNVRTQHGIVENMMIGSTPSMRRVFEQ	194		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1Y1-523	189	EAADERDELRL-REVR-----GKYG-----FENMVVGHPTMRRVFDQ	224		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1Y1-523	189	EAADERDELRL-REVR-----GKYG-----FENMVVGHPTMRRVFDQ	224		
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	177	YREQVCRR-----PQKEHHPRLNIVENAVGHSPSPMQRVFAQ	211		
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	181	RLQDEVRRMQ-KAIR-----PVQQ-----LDQ-VVGVSAAPMQQVFSQ	215		
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	181	SMQDEVRRMQ-KAIK-----PSQQ-----IDQ-VVGVSAAMQAVFQQ	215		
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	181	GA-EPVRRPR-KETI-----RAYQ-----IDN-TIGASAAAMQQVFAQ	214		
<i>Burkholderia</i> _sp_KJ006/1-572	181	RLQDEVRRMQ-KAIR-----PVQQ-----LDQ-VVGVSAAPMQQVFSQ	215		
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	181	GA-EPVRRPR-KETI-----RAYQ-----LDN-TIGASAAAMQQVFAQ	214		
<i>Azoarcus</i> _sp_BH72/1-518	185	DIAEERDNLRL-TYVR-----NRFG-----FDN-VGHTRQMRQVFEQ	219		
<i>Azoarcus</i> _sp_KH32C_(nifA1Y1-553	183	ALLEESARLQ-KQLQ-----GQYD-----IEN-VVGRSKRMKEVFAD	217		
<i>Azoarcus</i> _sp_KH32C_(nifA2Y1-544	183	APAADPHYV-----AVPRRRERYSLN-VVGNSSSMQKVFAE	218		
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_30309/1-584	196	RLIEKQPRPE-QSLDEDR---THPARHPHVKIDG-IIGESPALKQVLEI	239		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _1021/1-542	170	TFAEEQQEQQ-NSRDEQS---QSSARQRLKNDG-IIGESTALMTAVDT	213		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM11/1-542	170	TFAEEQQEQQ-NSRDEQS---QSSARQRLKNDG-IIGESTALMTAVDI	213		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm41/1-542	170	TFAEEQQEQQ-NSRDEQS---QSSARQRLKNDG-IIGESTALMTAVDT	213		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542	170	TFAEEQQEQQ-NSRDEQS---QSSARQRLKNDG-IIGESTALMTAVDT	213		
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	170	TFAEEQQEQQ-NSHDEQS---QGFAQRLLKNDG-IIGESPALMAAVET	213		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	222	PIGEEGDRKI-SAGDKEL---PEPTRQRPTRIDW-IVGESPALRQVVES	265		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	184	PIGEEGDRKI-SAGDKEL---PEPTRQRPTRIDW-IVGESPALRQVVES	227		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	222	PIGEEGDRKI-SAGDKEL---PEPTRQRPTRIDW-IVGESPALRQVVES	265		
<i>Rhizobium etli</i> _CIA_T_652/1-563	177	RPIGEQRPE-KPIIAQR---GAPGRHPPVKIDG-IIGDSPALQVVET	220		
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1Y1-586	199	RPIGEQRPE-KPLIAQA---SAPDRHPSVKIDG-IVGDSPALQVVET	242		
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2Y1-576	193	QIQPRRKRE-AAQR-----NDLGTQPPACMNL-IAGESPALKQVLDI	233		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_3841/1-520	149	SVAEEQQAGQIPKIK-----PKSHPTQVDKIDW-IVGESLALKRVLAT	190		
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	198	QIQQLHRKSA-EGGR-----NDPSQNSRAKVDW-IVGESPAVRRVLEI	238		
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	223	QSLVDKDRLE-KQTVDRG---PPARERKQLQAHG-IIGDSPALSALLEK	266		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	200	QSLVDKDRLE-KQTVDRG---PPARERKQLQAHG-IIGDSPALSALLEK	243		
<i>Bradyrhizobium</i> _sp_OR5_278/1-580	198	RLMAESHRLQ-KELMELK---PAPAKGKKVLDVG-IVGDSPALRALLDK	241		
<i>Bradyrhizobium</i> _sp_BTAI/1-581	198	RLMAESHRLQ-KELSELK---PASANRKKVLDVG-IVGDSPALRALLDK	241		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	200	RLMAESHRLQ-KELSELK---KPERERKRKYVDG-IVGESPAIRKLLAK	242		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	200	RLMAESHRLQ-KELYELK---KPQERKRKYVDG-IVGESPAIRTLLEK	242		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	197	RLMAESYRLQ-KELSELK---KPARERKKYVDG-IIGESPAIRLLAK	239		
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	222	RLIAQTHRLE-KALREEKSGAEPEVAEANGSAMG-IVGDSPLVKRLIAT	269		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	201	RIVQEAREAIRVAAEATA---GPPVEAPAEALEG-VIGSSPAIQRVIGQ	245		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	201	RIVQEAREAIRVAAEATA---GPPVEAPAEALEG-VIGSSPAIQRVIGQ	245		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	200	RIVQEAREAIRAAEATS---AAPAELPAEALDG-VIGSSAAIQRVIGQ	244		
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAI_5_(Brazil)	193	NLLHDSGLAQ-----PAPPVADGGGYMG-IVGDSPALRAVLQK	229		
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	230	RLFLEKARLE-KALP-----RPEKPLTGKYLEN-VVGRSQAILRVSAQ	270		
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1Y1-507	171	SLEEEKRALE-TELK-----RVYEKLH---VEG-IVGRSKEILNVLEI	208		
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	177	VFKEEIAALR-SELM-----KKFK-----LEG-FVGVSKAYYSIIKQ	211		



(ver legenda na página 203)

		310	320	330	340	350							
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	217	VHQSA	PSRST	MLLRG	ESGTG	KEVIARA	IHYLS	SPKDG	PF	IKVN	CAAL	SET	266
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	219	VHRVAP	FKSTVL	IRGES	GTGKEL	IARA	IHNMS	PRKDA	PF	IRVN	CAAL	PES	268
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	219	VHRVAP	FKSTVL	IRGES	GTGKEL	IARA	IHNMS	PRKDA	PF	IRVN	CAAL	PES	268
<i>Azospirillum</i> _sp._B510/1-642	221	VHRVAP	FKSTVL	IRGES	GTGKEL	IARA	IHNLS	SPKDA	PF	IRVN	CAAL	PES	270
<i>Azospirillum lipoferum</i> /1-633	221	VHRVAP	FKSTVL	IRGES	GTGKEL	IARA	IHNLS	SPKDA	PF	IRVN	CAAL	PES	270
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	235	VRQIAP	SRATV	LLRGES	GTGKEL	IAQA	IHYLS	PSDKP	PF	IKVN	CAAL	PET	284
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	223	LPP	IAASSAP	VLLRGES	GTGKEI	IFARA	IHELSP	RAKAS	F	IRVN	CAAL	SET	272
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	243	IKRVAST	RMPVLL	RGESGTG	KELFARAV	HAQSP	RAKGP	F	IRVN	CAAL	SET	292	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2)/1-580	240	IKRVAST	RMPVLL	RGESGTG	KELFARAV	HAQSP	RAKGP	F	IRVN	CAAL	SET	289	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	226	IRQVSR	WDTTVL	VRGES	GTGKEL	IANA	IHHSP	RAA	AF	VYKFN	CAAL	PDT	275
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA1)/1-523	225	IRRVAK	WNSTVL	VLGES	GTGKEL	IASA	IHYNSP	RAHRP	F	VRLN	CAAL	PET	274
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	226	IRQVSR	WDTTVL	VRGES	GTGKEL	IANA	IHHNSP	RAAA	AF	VYKFN	CAAL	PDN	275
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	225	VRRVAK	WNSTVL	ILGES	GTGKEL	IASA	IHYNSP	RAHQPL	VRLN	CAAL	PET	274	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A1501/1-522	225	VRRVAK	WNSTVL	ILGES	GTGKEL	IASA	IHYNSP	RAHQPL	VRLN	CAAL	PET	274	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA2)/1-486	195	IRQVAR	WDSTVL	VLGES	GTGKEL	IASA	IHCNSP	PARCPL	VRLN	CSSL	PET	244	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2)/1-486	195	IRQVAR	WDSTVL	VLGES	GTGKEL	IASA	IHCNSP	PARCPL	VRLN	CSSL	PET	244	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2)/1-486	195	IRQVAR	WDSTVL	VLGES	GTGKEL	IASA	IHCNSP	PARCPL	VRLN	CSSL	PET	244	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1)/1-523	225	IRRVAK	WNSTVL	VLGES	GTGKEL	IASA	IHYNSP	RAHRP	F	VRLN	CAAL	PET	274
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1)/1-523	225	IRRVAK	WNSTVL	VLGES	GTGKEL	IASA	IHYNSP	RAHRP	F	VRLN	CAAL	PET	274
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	212	VHQVAP	ARATV	LLRGES	GTGKEL	IARA	IYLSR	RNDQ	PF	VSVN	CAAL	SET	261
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	216	VHQVAP	ARTTV	LLRGES	GTGKEVI	IAARA	IHLSP	RNDHAF	ISVN	CAAL	TET	265	
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	216	VRQVAP	ARTTV	LLRGES	GTGKEVI	IAARA	IHNLS	SPSGD	SF	VRVN	CAAL	TES	265
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	215	VHQVAP	ARTTV	LLRGES	GTGKEL	IARS	ICRLSP	PRKEQ	PF	IAVN	CAAL	TET	264
<i>Burkholderia</i> _sp._KJ006/1-572	216	VHQVAP	ARTTV	LLRGES	GTGKEVI	IAARA	IHLSP	RNDHAF	ISVN	CAAL	TET	265	
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	215	VHQVAP	ARTTV	LLRGES	GTGKEL	IARS	ICRLSP	PRKEQ	PF	IAVN	CAAL	TET	264
<i>Azoarcus</i> _sp._BH72/1-518	220	IRQVAK	WNSTVL	VRGET	GTGKEL	IAQA	IHYNSP	RAAGP	F	VYKLN	CAAL	PEN	269
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA1)/1-553	218	VHQAAP	SGATV	LLRGES	GTGKEA	IAHA	IHYLS	PFVKG	PF	VYKLN	CAAL	PET	267
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA2)/1-544	219	VHQSA	PSRST	ILLRG	ESGTG	KEVIARS	IHYLS	PRDGP	F	IKVN	CAAL	SET	268
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_303099/1-584	240	VSVVART	NSTVLL	RGESGTG	KEFFAQA	IHKLS	HRREKS	FVKLN	CAAL	PES	289		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _102/1-542	214	AKVMAET	NSIVLL	RGETGTG	KECF	AKLIHQHST	QKKPF	IKFNCP	AL	SES	263		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM1/1-542	214	AKVMAET	NSIVLL	RGETGTG	KECF	AKLIHQHST	QKKPF	IKFNCP	AL	SES	263		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm4/1-542	214	AKVMAET	NSIVLL	RGETGTG	KECF	AKLIHQHST	QKKPF	IKFNCP	AL	SES	263		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _201/1-542	214	AKVMAET	NSIVLL	RGETGTG	KECF	AKLIHQHST	QKKPF	IKFNCP	AL	SES	263		
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	214	AKVMAET	NSIVLL	RGESGTG	KECF	AKLIHQHST	QKKPF	IKFNCP	AL	SES	263		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	266	VKVVAQT	NSAVLL	RGESGTG	KEFFAKA	IHELSP	RRKKP	FVKLN	CAAL	SAG	315		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	228	VKVVAQT	NSAVLL	RGESGTG	KEFFAKA	IHELSP	RRKKP	FVKLN	CAAL	SAG	277		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	266	VKVVAQT	NSAVLL	RGESGTG	KEFFAKA	IHELSP	RRKKP	FVKLN	CAAL	SAG	315		
<i>Rhizobium etli</i> _CIAT_652/1-563	221	VSVVART	NSTVLL	RGESGTG	KEFFAQA	IHELSP	RRKKP	FVKLN	CAAL	PEG	270		
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586	243	VSVVART	NSTVLL	RGESGTG	KEFFAQA	IHELSP	RRKKP	FVKLN	CAAL	PEG	292		
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576	234	VSAYAMT	NNTTVLL	RGESGTG	KEIFAQA	IHELSP	RRKKAF	FVKLN	CAAL	PEG	283		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_384/1-520	191	TKI	VAAATNS	AVLLRGES	GTGKECFARA	IHALS	IPKSKAF	IKLN	CAAL	SET	240		
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	239	VSAYAMT	NNTTVLL	RGESGTG	KEFFAQA	IHELSP	RRKKSF	FVKLN	CAAL	PEG	288		
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	267	IVVVAR	SNSVLL	RGESGTG	KELVAKA	IHESSV	RAKRPF	FVKLN	CAAL	PET	316		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	244	IVVVAR	SNSVLL	RGESGTG	KELVAKA	IHESSV	RAKRPF	FVKLN	CAAL	PET	293		
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._ORS_278/1-580	242	INVVAK	SNAPVLL	RGESGTG	KELVAKA	IHELSP	RAKRPF	IKLN	CAAL	PET	291		
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._BTA1/1-581	242	INVVAK	SNAPVLL	RGESGTG	KELVAKA	IHELSP	RAKRPF	IKLN	CAAL	PET	291		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	243	VSII	AKSQSPVLL	RGESGTG	KELIAKA	IHELSP	RAANGPF	IKLN	CAAL	PES	292		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	243	VSII	AKSQSPVLL	RGESGTG	KELIAKA	IHELSP	RAANGPF	IKLN	CAAL	PES	292		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	240	VSVII	AKSHSPVLL	RGESGTG	KELIAKA	IHELSP	RAANGPF	IKVN	CAAL	MAES	289		
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	270	AQVVAR	SNSVLL	RGESGTG	KELFARA	IHELSP	RAKGP	PF	VKN	CAAL	PES	319	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4/1-582	246	IRKVAG	THTPVLL	RGESGTG	KEVFARAL	HALSE	RDKAF	IKVN	CAAL	SQS	295		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	246	IRKVAG	THTPVLL	RGESGTG	KEVFARAL	HALSE	RDKAF	IKVN	CAAL	SQS	295		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	245	IRKVAG	THTPVLL	RGESGTG	KEVFARAL	HALSD	RDRPF	IKVN	CAAL	SQS	294		
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAI_5_(Brazil)	230	VEI	VARSDVT	VLLRGES	GTGKELFAQA	IHQAS	PHRKP	PF	VYKLN	CAAL	PES	279	
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	271	VRQVAP	SRATV	LLRGES	GTGKEL	IARA	IHYLS	PRADK	PF	IKVN	CAAL	PEN	320
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1)/1-507	209	VHRVAP	TNATV	LLRGES	GVGKEVFARA	IHLSP	RAKGP	PF	VAI	NCGA	IPGE	258	
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	212	VLK	IAELDVT	VMIRGES	GTGKTTLAKV	IHYLS	PRKKNP	PF	IE	INCSA	IPTE	261	



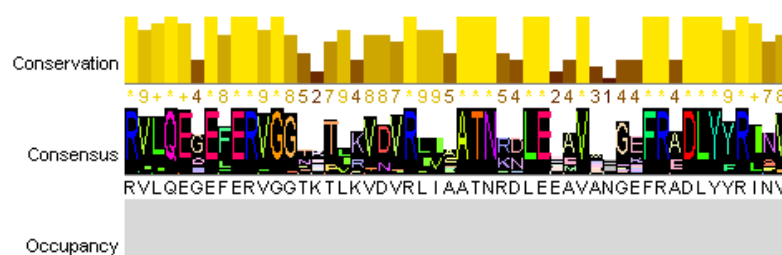
(ver legenda na página 203)

		360	370	380	390	400	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	267	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	QGERKGRFELAH	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	316
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	269	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	KDHKGRFELAS	GGTLFLDEIGD	ISPNFQAKLL	318
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	269	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	KDHKGRFELAS	GGTLFLDEIGD	ISPNFQAKLL	318
<i>Azospirillum</i> _sp_B510/1-642	271	LLESEL	FGHEKGSFTGAQ	KDHKGRFELAS	GGTLFLDEIGD	ISSNFQAKLL	320
<i>Azospirillum lipoferum</i> /1-633	271	LLESEL	FGHEKGSFTGAQ	KDHKGRFELAS	GGTLFLDEIGD	ISSNFQAKLL	320
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	285	LLESEL	FGHEKGAFTGAT	TERKGRFEMAS	GGTLFLDEIGE	ITVHFQAKLL	334
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	273	LLESEL	FGHEKGAFTGAL	ERRKGRFELAD	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	322
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	293	LLESEL	FGHEKGAFTGAT	ALKKGRFELAD	GGTLFLDEIGE	ISPAFQSKLL	342
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2)/1-580	290	LLESEL	FGHEKGAFTGAT	ALKKGRFELAD	GGTLFLDEIGE	ISPAFQSKLL	339
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	276	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	RQRKGRFELAD	GGTLFLDEIGESS	ASFAQAKLL	325
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA1)/1-523	275	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	KQRKGRFEQAD	GGTLFLDEIGE	ISPMFQAKLL	324
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	276	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	RQRKGRFELAD	GGTLFLDEIGESS	ASFAQAKLL	325
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	275	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	KQRKGRFEQAD	GGTLFLDEIGE	ISPMFQAKLL	324
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A1501/1-522	275	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	KQRKGRFEQAD	GGTLFLDEIGE	ISPMFQAKLL	324
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA2)/1-486	245	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	KQRKGRFEQAD	GGTLFLDEIGE	ISPTFQAKLL	294
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2)/1-486	245	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	KQRKGRFEQAD	GGTLFLDEIGE	ISPTFQAKLL	294
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2)/1-486	245	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	KQRKGRFEQAD	GGTLFLDEIGE	ISPTFQAKLL	294
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1)/1-523	275	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	KQRKGRFEQAD	GGTLFLDEIGE	ISPMFQAKLL	324
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1)/1-523	275	LLESEL	FGHEKGAFTGAV	KQRKGRFEQAD	GGTLFLDEIGE	ISPMFQAKLL	324
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	262	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	SQRKGRFELAH	GGTLFLDEIGD	ISPSFQAKLL	311
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	266	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	GLRKGRFELAH	GGTLFLDEIGD	ISPSFQAKLL	315
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	266	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	GLRKGRFELAH	GGTLFLDEIGD	ISPSFQAKLL	315
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	265	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	SQRKGRFELAH	GGTLFLDEIGD	ISSSFQAKLL	314
<i>Burkholderia</i> _sp_KJ006/1-572	266	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	GLRKGRFELAH	GGTLFLDEIGD	ISPSFQAKLL	315
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	265	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	SQRKGRFELAH	GGTLFLDEIGD	ISSSFQAKLL	314
<i>Azoarcus</i> _sp_BH72/1-518	270	LLESEL	FGHEKGAFTGAL	TQRKGRFEMAD	GGTLFLDEIGS	ISAFQAKLL	319
<i>Azoarcus</i> _sp_KH32C_(nifA1)/1-553	268	LLESEL	FGHEKGAFTGA	TSEKGRFELAR	GGTLFLDEIGD	ISPAFQAKLL	317
<i>Azoarcus</i> _sp_KH32C_(nifA2)/1-544	269	LLESEL	FGHEKGAFTGAQ	FERKGRFELAN	GGTLFLDEIGE	ISLAFQAKLL	318
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_303099/1-584	290	VLESEL	FGHEKGAFTGA	ILQRAGRFELAN	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	339
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _1021/1-542	264	LLESEL	FGHEKGAFTGA	AQRVGRFESAN	GGTLFLDEIGE	IPPAFQAKLL	313
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM1/1-542	264	LLESEL	FGHEKGAFTGA	AQRVGRFESAN	GGTLFLDEIGE	IPPAFQAKLL	313
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm41/1-542	264	LLESEL	FGHEKGAFTGA	AQRVGRFESAN	GGTLFLDEIGE	IPPAFQAKLL	313
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542	264	LLESEL	FGHEKGAFTGA	AQRVGRFESAN	GGTLFLDEIGE	IPPAFQAKLL	313
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	264	LLESEL	FGHEKGAFTGA	AQRVGRFESAN	GGTLFLDEIGE	IPPAFQAKLL	313
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	316	VLESEL	FGHEKGAFTGA	ISQRAGRFELAD	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	365
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HF103/1-557	278	LLESEL	FGHEKGAFTGA	ISQRAGRFELAD	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	327
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	316	VLESEL	FGHEKGAFTGA	ISQRAGRFELAD	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	365
<i>Rhizobium etli</i> _CIAT_652/1-563	271	VLESEL	FGHEKGAFTGA	AQRAGRFELAN	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	320
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586	293	VLESEL	FGHEKGAFTGA	AQRAGRFELAN	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	342
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576	284	LLESEL	FGHEKGAFTGA	ISQRAGRFELAN	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	333
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_384/1-520	241	VLESEL	FGHEKGAFTGAL	LQRAGRFELAN	GGTLFLDEIGD	VSPQFQAKLL	290
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	289	VLESEL	FGHEKGAFTGA	VSQRAGRFELAN	GGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	338
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	317	VLESEL	FGHEKGAFTGA	VSARKGRFELAD	KGTLFLDEIGE	ISPFQAKLL	366
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	294	VLESEL	FGHEKGAFTGA	VSARKGRFELAD	KGTLFLDEIGE	ISPPFQAKLL	343
<i>Bradyrhizobium</i> _sp_OR5_278/1-580	292	VLESEL	FGHEKGAFTGA	INSRKGRFELAD	KGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	341
<i>Bradyrhizobium</i> _sp_BTAI/1-581	292	VLESEL	FGHEKGAFTGA	INSRKGRFELAD	KGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	341
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	293	VLESEL	FGHEKGAFTGA	ASRKGRFELAD	KGTLFLDEIGE	ISASFAQAKLL	342
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	293	VLESEL	FGHEKGAFTGA	ASRKGRFELAD	KGTLFLDEIGE	ISASFAQAKLL	342
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	290	VLESEL	FGHEKGAFTGA	ATRKGRFELAD	KGTLFLDEIGE	ISPAFQAKLL	339
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	320	VLESEL	FGHEKGAFTGA	LNMRQGRFELAH	GGTLFLDEIGE	ITPAFQAKLL	369
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	296	LLESEL	FGHEKGSFTGA	VQKKGRFEMA	EGGTLFLDEIGE	ISLEFQAKLL	345
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	296	LLESEL	FGHEKGSFTGA	VQKKGRFEMA	EGGTLFLDEIGE	ISLEFQAKLL	345
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	295	LLESEL	FGHEKGSFTGA	VQKKGRFELAD	GGTLFLDEIGE	ISLEFQAKLL	344
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAI_5_(Brazil)	280	VLESEL	FGHEKGAFTGA	IGQRKGRFELAD	GGTLFLMDEIGE	ISPSFQAKLL	329
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	321	LLESEL	FGHEKGSFTGA	TSEKGRFELAH	GGTLFLDEIGE	ITPHFQAKLL	370
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1)/1-507	259	LLESEL	FGYEGKAFTGA	YS TKKGRFELAN	GGTLFLDEIGEL	PLHLQVQKLL	308
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	262	LLESEL	FGYEGKAFTGA	YTT KMGRFELAN	GGTLFLDEIGD	LNLTQAKLL	311



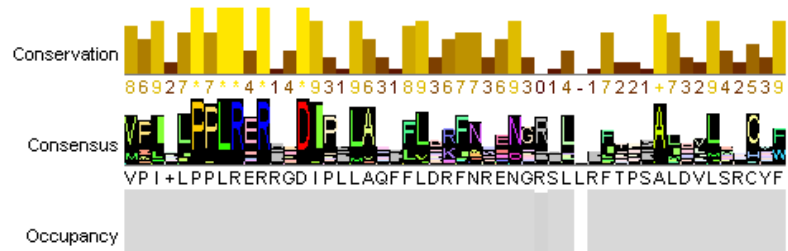
(ver legenda na página 203)

		410	420	430	440	450	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	317	RVLQGEREFERVGGSR	IKVDVRLVTATNRDL	EKAVAKGEFRADLYYR	INV	366	
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	319	RVLQGEQEFERVGGSKT	IKTDVRLICATNLNL	EEAVGHGKFRADLYFR	INV	368	
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	319	RVLQGEQEFERVGGSKT	IKTDVRLICATNLNL	EEAVGHGKFRADLYFR	INV	368	
<i>Azospirillum</i> _sp._B510/1-642	321	RVLQGEQEFERVGGSKT	IKTDVRLICATNLNL	EEAVGHGKFRADLYFR	INV	370	
<i>Azospirillum</i> _tipoferum/1-633	321	RVLQGEQEFERVGGSKT	IKTDVRLICATNLNL	EEAVGHGKFRADLYFR	INV	370	
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	335	RVLQGEQEFERVGGGKT	IKVDVRLVAATNKDL	EDAVTRGEFRADLYYR	INV	384	
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	323	RVLQGEQELERVGGSGT	IRVNTRIIAATNRDL	ESDVRSGRFRADLYYR	IAV	372	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	343	RVLQGEQEFERVGGAKT	IKVDTRIIVAAATNRDL	EDAVARGQFRADLYFR	ICV	392	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2)/1-580	340	RVLQGEQEFERVGGAKT	IKVDTRIIVAAATNRDL	EDAVARGQFRADLYFR	ICV	389	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	326	RILQGEQEMERVGGDET	ILRVNVR IIAATNRHL	EEVRLQHFREDLYYRL	INV	375	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA1)/1-523	325	RVLQGEQEFERVGGNQT	IVRVNVR IIVAAATNRDL	EEVEKGKFRADLYYRL	INV	374	
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	326	RILQGEQEMERVGGDET	ILRVNVR IIAATNRHL	EEVRLQHFREDLYYRL	INV	375	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	325	RVLQGEQELERVGGTQT	IVRVNVR IIVAAATNRDL	EEVEQGGKFRADLYYRL	INV	374	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A1501/1-522	325	RVLQGEQELERVGGTQT	IVRVNVR IIVAAATNRDL	EEVEQGGKFRADLYYRL	INV	374	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA2)/1-486	295	RVLQGEQEFERVGGNQT	IVRVNVR IIVAAATNRDL	EEVKKGNFRADLYYRL	INV	344	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2)/1-486	295	RVLQGEQEFERVGGNQT	IVRVNVR IIVAAATNRDL	EEVKKGNFRADLYYRL	INV	344	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2)/1-486	295	RVLQGEQEFERVGGNQT	IVRVNVR IIVAAATNRDL	EEVKKGNFRADLYYRL	INV	344	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1)/1-523	325	RVLQGEQEFERVGGNQT	IVRVNVR IIVAAATNRDL	EEVEKGKFRADLYYRL	INV	374	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1)/1-523	325	RVLQGEQEFERVGGNQT	IVRVNVR IIVAAATNRDL	EEVEKGKFRADLYYRL	INV	374	
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	312	RVLQGEREFERVGGATP	VRVDVRL IIVATNRNL	ERMVKEGEFRADLYYR	INV	361	
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	316	RVLQGEREFERVGGAAP	VPKVDVRL IILATNRNL	ERMVKEGEFRADLYYR	INV	365	
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	316	RVLQGEREFERVGGTTP	VPKVDVRL IILATNRNL	ERMVKEGEFRADLYYR	INV	365	
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	315	RVLQGEREFERVGGATP	VRVDVRL IIVATNRNL	ERMVRDGEFRADLYYR	INV	364	
<i>Burkholderia</i> _sp._KJ006/1-572	316	RVLQGEREFERVGGAAP	VPKVDVRL IILATNRNL	ERMVKEGEFRADLYYR	INV	365	
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	315	RVLQGEREFERVGGATP	VRVDVRL IIVATNRNL	ERMVRDGEFRADLYYR	INV	364	
<i>Azoarcus</i> _sp._BH72/1-518	320	RVLQGEQELERVGGART	ILRVDRV IIAATNRDL	EEVEACKFRADLYYRL	INV	369	
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA1)/1-553	318	RVLQGEQEFERVGGNKT	IKTDVRLVAATNRNL	EEVMQKNEFRADLYYRL	INV	367	
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA2)/1-544	319	RVLQGEREFERVGGNRP	IKVDVRL IITATNRDL	ERAVTKGEFRADLYYR	INV	368	
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_303099/1-584	340	RVLQGEQELERVGGTRT	ILKVDVRL IICATNKDL	EMAVRNGEFRADLYYR	INV	389	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _1021/1-542	314	RVLQGEQEFERVGGTKT	ILKVDVRL IIFATNKDL	EMAVQNGEFRADLYYR	ISG	363	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM11/1-542	314	RVLQGEQEFERVGGTKT	ILKVDVRL IIFATNKDL	EMAVQNGEFRADLYYR	ISG	363	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm4/1-542	314	RVLQGEQEFERVGGTKT	ILKVDVRL IIFATNKDL	EMAVQNGEFRADLYYR	ISG	363	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542	314	RVLQGEQEFERVGGTKT	ILKVDVRL IIFATNKDL	EMAVQNGEFRADLYYR	ISG	363	
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	314	RVLQGEQEFERVGGTKT	ILKVDVRL IIFATNKDL	EMAVRNGEFRADLYYR	ISV	363	
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	366	RVLQGEQELERVGGTKT	ILKVDVRL IICATNKDL	ETAVAEGEFRADLYYR	INV	415	
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	328	RVLQGEQELERVGGTKT	ILKVDVRL IICATNKDL	ETAVAEGEFRADLYYR	INV	377	
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	366	RVLQGEQELERVGGTKT	ILKVDVRL IICATNKDL	ETAVAEGEFRADLYYR	INV	415	
<i>Rhizobium etli</i> _CIAT_652/1-563	321	RVLQGEQELERVGGTKT	ILAVDVRL IICATNKDL	EMAVANAEFRADLYYR	ISV	370	
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586	343	RVLQGEQELERVGGTKT	ILAVDVRL IICATNKDL	EMAVANAEFRADLYYR	ISV	392	
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576	334	RVLQGEQELERVGGTKT	ILKVDVRL IICATNKDL	EAASNGEFRADLYYR	ISV	383	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_3841/1-520	291	RVLQGEQEFERLGGTKT	ILKVDVRL IICATNKDL	EMAVLNGEFRADLYYR	INV	340	
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	339	RVLQGEQELERVGGTKT	ILKVDVRL IICATNKDL	EAASNGEFRADLYYR	INV	388	
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	367	RVLQGEQEFERVGSNHT	IKVDVRL IIAATNRNL	EEAVARSEFRADLYYR	ISV	416	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	344	RVLQGEQEFERVGSNHT	IKVDVRL IIAATNRNL	EEAVARSEFRADLYYR	ISV	393	
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._ORS_278/1-580	342	RVLQGEQEFERVGGNQT	IKVDVRL IIVATNRNL	EEAVARNEFRADLYYR	ISV	391	
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._BTAI/1-581	342	RVLQGEQEFERVGGNQT	IKVDVRL IIVATNRNL	EEAVARNEFRADLYYR	ISV	391	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	343	RVLQGEQEFERVGGNQT	IKVNVRL IIVAAATNRNL	EEAVARKEFRADLYYR	INV	392	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	343	RVLQGEQEFERVGGNQT	IKVNVRL IIVAAATNRNL	EEAVARKEFRADLYYR	INV	392	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	340	RVLQGEQEFERVGGNHT	IKVNVRL IIVAAATNRNL	EEAVAKNEFRADLYYR	INV	389	
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	370	RVLQGEQEFERVGGNRT	ILKVDVRL IICATNKDL	EEAVSKGEFRADLYYR	IHV	419	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	346	RILQGEQEFERVGGTRT	ILRVDRV LVTATNKDL	ERAVANGTFRADLYFR	ICV	395	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	346	RILQGEQEFERVGGTRT	ILRVDRV LVTATNKDL	ERAVANGTFRADLYFR	ICV	395	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	345	RILQGEQEFERVGGSR	TLKVDVRLVTATNKDL	ERAVANGTFRADLYFR	ICV	394	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAI_5_(Brazil)	330	RVLQGEQEFERVGGTRT	ILKVDVRLVTATNRNL	EEAVSKGRFRADLYYR	ISV	379	
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	371	RVLQGEQEFERVGGNRT	ILSVDVRLVTATNKDL	EDAVVKGEFRADLYYR	INV	420	
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1)/1-507	309	RAIQEKEIERIGGTRP	IKVDVRL IIAATNRDL	ESMVRGKFRADLYYRL	INV	358	
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	312	RFMQTKERFERLGSNRT	IKSDVRL IIVATNKDL	EDMVTNGEFRADLYYR	IAV	361	



(ver legenda na página 203)

		460	470	480	490	500	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	367	VSIFIPPLRERREDIPY	VEHFLEKFRVENGRAMVAM	SPQAMKVMNCYVW	416		
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	369	VTIHLPLRERPGDIGPL	ARHFVAKFAKDNG-MAL	YMEDEALEVLNRC	417		
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	369	VTIHLPLRERPGDIGPL	ARHFVAKFAKDNG-MAL	YMEDEALEVLNRC	417		
<i>Azospirillum</i> _sp._B510/1-642	371	VTIHLPLRERPGDIGPL	AKHFVTKFGRDNGNL	-DIDHDALEVLNRC	419		
<i>Azospirillum</i> _lipoferum/1-633	371	VTIHLPLRERPGDIGPL	AKHFVAKFARDNGLAL	-DIDRDALEVLNRC	419		
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	385	VPIFLPALRERREDVPL	LAQFFLTKEFNEENGRSL	-RFSEGAALTAMGGC	433		
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	373	VPVLLPLRERESDIPAL	AQAFLKRFNADNGRNL	-SFAPAALSVLGGCYF	421		
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	393	VPIVLPLRNRKSDIKPL	AQLFLDRFNKQGNATNV	-KFAADAFDQICRCQF	441		
<i>Rhodobacter stutzeri</i> _A150/1-520	390	VPIVLPLRNRKSDIKPL	AQLFLDRFNKQGNATNV	-KFAADAFDQICRCQF	438		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	376	MPIALPLRERQEDIAEL	AHFVLRKIGQHGGRTL	-RISGAIRLLMEYSW	424		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA1)/1-523	375	MAIRIPPLRERTADIPEL	AEFLLGKIGRQQGRPL	-TVTDSAIRLLMSHRW	423		
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	376	MPIALPLRERQEDIAEL	AHFVLRKIAHGQGRTL	-RISDGAIRLLMEYSW	424		
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	375	MAIRVPLRERSADIPEL	AEFLIDKIGRQQGRPL	-KLTDALRLLMSHRW	423		
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A150/1-522	375	MAIRVPLRERSADIPEL	AEFLIDKIGRQQGRPL	-KLTDALRLLMSHRW	423		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA2)/1-486	345	MPIQAPPLRERLADIPEL	ARFLDLKSSQGGGRSL	-DITDCAIEVLKHHW	393		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2)/1-486	345	MPIQAPPLRERLADIPEL	ARFLDLKSSQGGGRSL	-DITDCAIEVLKHHW	393		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2)/1-486	345	MPIQAPPLRERLADIPEL	ARFLDLKSSQGGGRSL	-DITDCAIEVLKHHW	393		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1)/1-523	375	MAIRIPPLRERTADIPEL	AEFLLGKIGRQQGRPL	-TVTDSAIRLLMSHRW	423		
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1)/1-523	375	MAIRIPPLRERTADIPEL	AEFLLGKIGRQQGRPL	-TVTDSAIRLLMSHRW	423		
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	362	VSIRLPLRERREDIPAL	AQYFLDRFNDRNGRSL	-RFTEGALSVLGGCYW	410		
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	366	VSISLPLRERREDIPAM	AQHFLDRFNDRNGRSL	-RFSDEAMRVLTSCYW	414		
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	366	VSISLPLRERREDIPAM	AQHFLARFNRENAQSI	-RFDASAMRVLTSCYW	414		
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	365	VSISLPLRERREDIPAM	AQYFLDRFNDRNGRSL	-RFSDEALRVLSNCRYW	413		
<i>Burkholderia</i> _sp._KJ006/1-572	366	VSISLPLRERREDIPAM	AQHFLDRFNDRNGRSL	-RFSDEAMRVLTSCYW	414		
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	365	VSISLPLRERREDIPAM	AQYFLDRFNDRNGRSL	-RFSDEALRVLSNCRYW	413		
<i>Azoarcus</i> _sp._BH72/1-518	370	MPIMLPLRERVEDIPEI	ARFLVEKYSQGGGRPL	-SITDSALRILLHHAW	418		
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA1)/1-553	368	VAIFLPLRERKDDIPL	VDFIERFNTENRRQL	-AITPGAVIDLMQCNW	416		
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA2)/1-544	369	VSIFMPLRERREDIPAL	VQHFLTRYCSNDREL	-DIAPEAMHILKHCYW	417		
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_30309/1-584	390	VPIVLPLRERPGDIGPL	AKALLDRFNKENHRDL	-AFTPSALDLISQCYF	438		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _1021/1-542	364	VPLILPLRHRDGDIPPL	ARAFLRQFNEENGRDL	-HFAPSALDHLKCKF	412		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM11/1-542	364	VPLILPLRHRDGDIPPL	ARAFLRQFNEENGRDL	-HFAPSALDHLKCKF	412		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm41/1-542	364	VPLILPLRHRDGDIPPL	ARAFLRQFNEENGRDL	-HFAPSALDHLKCKF	412		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542	364	VPLILPLRHRDGDIPPL	ARAFLRQFNEENGRDL	-HFAPSALDHLKCKF	412		
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	364	VPIITLPLRKRGDIPPL	AKAFLRQFNEENGRDL	-HFVPSALDHLKCKF	412		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	416	VPLFLPLRERNGDIGPL	AKVFLDRFNRENNRNL	-EFTPAALILSRCKF	464		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	378	VPLFLPLRERNGDIGPL	AKVFLDRFNRENNRNL	-EFTPAALILSRCKF	426		
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	416	VPLFLPLRERNGDIGPL	AKVFLDRFNRENNRNL	-EFTPAALILSRCKF	464		
<i>Rhizobium etli</i> _CIA_T_652/1-563	371	VPIVLPLRERPGDIGPL	ANALLDRFNKENGREL	-TFSSSAIEVMSQCYF	419		
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586	393	VPIVLPLRERPGDIGPL	AKVLLNRFNKENGTSL	-TFTPSAIDVMSQCYF	441		
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576	384	VPIVLPLRERPGDIGPL	AKVLLNRFNKENGTSL	-TFTPSAIDVMSQCYF	432		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_384/1-520	341	VPIILPLRQRDGDISL	AQVFLQGFNKANDRNF	-DFAPSAIGIMSKCAF	389		
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	389	VPIVLPLRERPGDIGPL	SKVFLDRFNRENNREH	-AFTAQALDLISQCYF	437		
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	417	VPLLLPLRERESDIPPL	AREFLRKFNSENGRSL	-TLEASAIDVLMCKF	465		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	394	VPLLLPLRERESDIPPL	AREFLRKFNSENGRSL	-TLEASAIDVLMCKF	442		
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._ORS_278/1-580	392	VPIKLPLRDRSDIPQL	AREFLRRFNCENERDL	-TFDVSAIEVLMHCGF	440		
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._BTAl/1-581	392	VPIKLPLRDRSDIPQL	AREFLRRFNCENERDL	-TFDVSAIEVLMHCGF	440		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	393	VPMILPLRDRPTDIPPL	ASEFLKNFNKENOREL	-AFESHALDLLKACSF	441		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	393	VPMILPLRDRPTDIPPL	ASEFLKNFNKENOREL	-QFEPHALELLKACSF	441		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	390	VPMILPLRDRPTDIPPL	AGAFLENFNKENEREL	-AFDSTSMELLKGCFS	438		
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	420	VPLILPLRERPGDIGPL	AKNFLDRFNKENKLMH	-MLSAPADVLRRCYF	468		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	396	VPIVLPLRDRKEDIGL	AQGLLERFNKRNMGKK	-KLHPSAVALAQCNF	444		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	396	VPIVLPLRDRKEDIGL	AQGLLERFNKRNMGKK	-KLHPSAVALAQCNF	444		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	395	VPIVLPLRDRKEDIGL	AQGLLERFNKRNMGKK	-RLHPSAISALAEENF	443		
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAI_5_(Brazil)	380	IPIFLPLRDRPTDIPML	ANEFLRRFNETNRTSL	-TIASDGMVLTTCYF	428		
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	421	VPIFLPALREREDVPL	LAQFFLDKYNEENARS	-RFSEAAIDVVMGHCFS	469		
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1)/1-507	359	VPIFIPPLRERKEDIPV	LHYFLEKFSKEYNKEV	-SITQEVMDAFMKYEW	407		
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	362	YPIYIPPLRERKEDIPML	VEYCIKQIGSMGKKL	-RINKDALGILTSCDF	410		



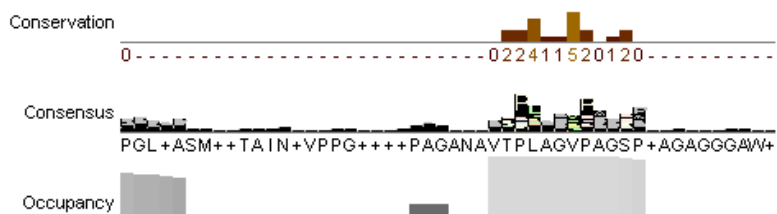
(ver legenda na página 203)

		510	520	530	540	550	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	417	PGNVRELENCV	ERTATMMRGDL	ITÉVHFSCQQNKCL	TKVLHEPGQQQPVV	466	
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	418	PGNVRELENCI	ERAATQSRDGI	IRTESLSCSLNLCN	SSVLFQYRTLGAASV	467	
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	418	PGNVRELENCI	ERAATQSRDGI	IRTESLSCSLNLCN	SSVLFQYRTLGAASV	467	
<i>Azospirillum</i> _sp._B510/1-642	420	PGNVRELENCI	ERAATQCRNGT	IRVPDLSCSMNLCN	SSVLFQYRNMGAASV	469	
<i>Azospirillum lipoferum</i> /1-633	420	PGNVRELENCI	ERAATQCRNGT	IRVPDLSCSMNLCN	SSVLFQYRTMGAAV	469	
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	434	PGNVRELENCV	CRAAATLAQDEV	IQELGLSCHNDKCL	SASLWQRRGSGRAI	483	
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	422	PGNVRELENCV	KRAATLARGSV	ITAPELTCQHESCL	SAGLLPSREMKAAP	471	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	442	PGNVRELENCV	NRAAALS DGA	IVLAEELACRQGACL	SAELFRLQDGTSP	491	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2)/1-580	439	PGNVRELENCV	NRAAALS DGA	IVLAEELACRQGACL	SAELFRLQDGTSP	488	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	425	PGNVRELENCLE	RSAYMSESGL	IDRDVILFTHQ	-----	457	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _D.J._(nifA1)/1-523	424	PGNVRELENCLE	RSAIMSEDGT	ITRD	-----	449	
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	425	PGNVRELENCLE	RSAYMSESGL	IDRDVILFNHR	-----	457	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	424	PGNVRELENCLE	RSAIMSEDGT	ISRD	-----	449	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A1501/1-522	424	PGNVRELENCLE	RSAIMSEDGT	ISRD	-----	449	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _D.J._(nifA2)/1-486	394	PGNVRELENCLE	RSSIMSENGV	ITRN	-----	419	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2)/1-486	394	PGNVRELENCLE	RSSIMSENGV	ITRN	-----	419	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2)/1-486	394	PGNVRELENCLE	RSSIMSENGV	ITRN	-----	419	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1)/1-523	424	PGNVRELENCLE	RSAIMSEDGT	ITRD	-----	449	
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1)/1-523	424	PGNVRELENCLE	RSAIMSEDGT	ITRD	-----	449	
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	411	AGNVRELENCV	ERTATMALHDS	IDRLSFLCEMDKCL	TQGLHDIEREDAVR	460	
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	415	PGNVRELENCV	ERTATMTHHDT	IDRLAFLCQEDRCL	TKVLHHIEREDAVR	464	
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	415	PGNVRELENCV	ERTATMTRDGV	IDRFKFLCQEDRCL	TKVLHHIEREDAVR	464	
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	414	PGNVRELENCV	ERTATMTHHDT	IDRLSFLCEIDQCL	TKVLHHIEREDAVR	463	
<i>Burkholderia</i> _sp._KJ006/1-572	415	PGNVRELENCV	ERTATMTHHDT	IDRLAFLCQEDRCL	TKVLHHIEREDAVR	464	
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	414	PGNVRELENCV	ERTATMTHHDT	IDRLSFLCEIDQCL	TKVLHHIEREDAVR	463	
<i>Azoarcus</i> _sp._BH72/1-518	419	PGNVRELENCI	ERAAYMSEDGT	IDRD	-----	444	
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA1)/1-553	417	PGNVRELENCI	QRAATMTRSNI	IREADMRCQKGC	QFSSMLLETTQSRA	464	
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA2)/1-544	418	PGNVRELENCI	ERTATMTRGGV	IRETNIPCHFNRCL	TQVLHVLTEDSCE	467	
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_303099/1-584	439	PGNVRELENCV	RRTATLARSMIT	TPSDFACQNSQCL	SSLLWKGVGVRSHGA	488	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _1021/1-542	413	PGNVRELENCV	RRTATLARSKTI	TSSDFACQTDQCF	SSRLWKGHVCHSHGH	462	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM11/1-542	413	PGNVRELENCV	RRTATLARSKTI	TSSDFACQTDQCF	SSRLWKGHVCHSHGH	462	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm41/1-542	413	PGNVRELENCV	RRTATLARSKTI	TSSDFACQTDQCF	SSRLWKGHVCHSHGH	462	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542	413	PGNVRELENCV	RRTATLARSKTI	TSSDFACQTDQCF	SSRLWKGHVCHSHGH	462	
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	413	PGNVRELENCV	RRTATLARAKTI	TSSDFACQTDQCF	SSRLWKGIRCSHCH	462	
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	465	PGNVRELENCV	RRTATLARSATI	VPSDFSCQNDQCF	SSMLGKTADRPLGS	514	
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	427	PGNVRELENCV	RRTATLARSGTI	VPSDFSCQNAQCF	SSMLGKTADRPLGT	476	
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	465	PGNVRELENCV	RRTATLARSGTI	VPSDFSCQNAQCF	SSMLGKTADRPLGT	514	
<i>Rhizobium etli</i> _CIAT_652/1-563	420	PGNVRELENCV	RRTATLARSSS	VSSDFACKNSQCL	SSLLWKG-TDGP	468	
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586	442	PGNVRELENCV	RRTATLARNSI	VSSDFACKNGQCL	SSLLWKGAEGPS	491	
<i>Rhizobium etli</i> _bv_mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576	433	PGNVRELENCV	RRTATLAHSTI	VPSDFACRKGQCF	SSRLWKGSPGGVSA	482	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv_viciae_3841/1-520	390	PGNVRELENCV	QRTATLASSNT	IASSDFACQGGQCL	SALLWKGIDGRDIDN	439	
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	438	PGNVRELENCV	RRTATLARSKTI	VPSDFACQNNQCL	SARLWKGDDGGGREG	487	
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	466	PGNVRELENCI	ERTATLSAGTS	IVRSDFACSQGQCL	STTLWKSSTSYGKTD	515	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	443	PGNVRELENCI	ERTATLSAGTS	IVRSDFACSQGQCL	STTLWKSSTSYGKTD	492	
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._ORS_278/1-580	441	PGNVRELENCV	QRTATLAAGSA	IGQHDFACSRNECMSA	ILWKGNTVTTPP	490	
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._BTA1/1-581	441	PGNVRELENCV	QRTATLAAGSA	IGQHDFACSRNECMSA	ILWKGNTVTTPP	490	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	442	PGNVRELENCV	RRTATLAMGPE	IRDSDFACHQDECLSA	ILWKGHAEPAP	491	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	442	PGNVRELENCV	RRTATLAIGPE	ITDSDFACHQDECLSA	ILWKG-HAEPAP	490	
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	439	PGNVRELENCV	RRTATLAPGPA	IHADDFACHHDECLSS	ILWKSHTERLTP	488	
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	469	PGNVRELENCI	RRTATLAHDAV	ITPHDFACDSGQCL	SAMLWKGSAKPKVM	518	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	445	PGNVRELENCI	ARVAALSPETV	IHADDLACHHDHCL	SADLWLRLQTGSASP	494	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	445	PGNVRELENCI	ARVAALSPETV	IHADDLACHHDHCL	SADLWLRLQTGSASP	494	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	444	PGNVRELENCI	ARVAALSPESV	IHADDLACHHDHCL	SADLWLRLQTGGASP	493	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PA1_5_(Brazil)	429	PGNVRELENCI	RRTATLAPGQT	IGAADFACRSDGCLSS	IFWRPAAPAPGP	478	
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	470	PGNVRELENCV	YRAATLAQGDV	IQDFGLSCHRHHQCL	SATLWKKRRGTGKA	519	
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1)/1-507	408	KGNVRELENCV	LYLERMVI	LDTDGVLSEEDL	-----	436	
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	411	PGNVRELEISCL	TRAAISSSTGI	IQPDIDISIGSGVCF	SHLIKYSYADKDN	460	



(ver legenda na página 203)

	560	570	580	590	600
<i>Herbaspirillum_seropedicae_SmR1/1-543</i>	467	-----V	VPLERISAHTA-----	478	
<i>Azospirillum_brasilense_Sp7/1-625</i>	468	GGLAPSMGPGA	INRVPPGRPGGPA	AAANAPKTPAMPAPVPEPAGAGGGAMP	517
<i>Azospirillum_brasilense_FP2/1-626</i>	468	GGLAPSMGPGA	INRVPPGRPGGPA	AAANAPKTPAMPAPVPEPAGAGGGAMP	517
<i>Azospirillum_sp_B510/1-642</i>	470	GGLAPSMGTA	INPAQPGPTPARPQLPT	IPAMPVPANGAAGGTVDGTFN	519
<i>Azospirillum_lipoferum/1-633</i>	470	GGLAPSMGTP	INPSGANPALGRPQ---	QPPIACMPPAVPAPAPANGAAN	516
<i>Rhodospirillum_rubrum_F11/1-601</i>	484	GGLAP---	VTEQNDPDTTSVAMEGD---	LRPAAPARAGTP-----	517
<i>Rhodospirillum_centenum/1-558</i>	472	AQG---	-----FTPLADVKLAPP-----	486	
<i>Rhodobacter_capsulatus/1-583</i>	492	GGLAVGRV-----	-----ITPTVRVSAPP-----	511	
<i>Rhodobacter_capsulatus/2Y1-580</i>	489	GGLAV-----	-----GRV-----ITPTVRVSAPP-----	508	
<i>Klebsiella_pneumoniae_342/1-525</i>	458	-----	-----DRPAKALPASGP-----	469	
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ_(nifA1Y1-523)</i>	450	-----	-----VVS LTGV DNESP-----	461	
<i>Klebsiella_michiganensis_E718/1-525</i>	458	-----	-----DNPPKALPNGGG-----	469	
<i>Pseudomonas_stutzeri_DSM_4166/1-522</i>	450	-----	-----VVS LTGLDHDAT-----	461	
<i>Pseudomonas_stutzeri_A150/1-522</i>	450	-----	-----VVS LTGLDHDAT-----	461	
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ_(nifA2Y1-486)</i>	420	-----	-----VLS LAGLDDGGS-----	431	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA_(nifA2Y1-486)</i>	420	-----	-----VLS LAGLDDGGS-----	431	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6_(nifA2Y1-486)</i>	420	-----	-----VLS LAGLDDGGS-----	431	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA_(nifA1Y1-523)</i>	450	-----	-----VVS LTGV DNESP-----	461	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6_(nifA1Y1-523)</i>	450	-----	-----VVS LTGV DNESP-----	461	
<i>Cupriavidus_taiwanensis/1-544</i>	461	PGRSA-----	-----NAAASEE-----ITPTVSYVDAGHE-----	484	
<i>Burkholderia_vietnamiensis_G4/1-570</i>	465	PARLL-----	-----DIPICEVPAPGA-----	481	
<i>Paraburkholderia_xenovorans_LB400/1-573</i>	465	PARLA-----	-----DIPAEVSSSQP-----	481	
<i>Paraburkholderia_phymatum/1-548</i>	464	PGPSS-----	-----NLVASEAPNALA-----	480	
<i>Burkholderia_sp_KJ006/1-572</i>	465	PARLL-----	-----DIPICEVPAPGA-----	481	
<i>Paraburkholderia_phenoliruptrix/1-548</i>	464	PGPSS-----	-----NLVASEAPNALA-----	480	
<i>Azoarcus_sp_BH72/1-518</i>	445	-----	-----LILISGLEERT-----	456	
<i>Azoarcus_sp_KH32C_(nifA1Y1-553)</i>	465	-----	-----CFPLICVPSRAS-----	476	
<i>Azoarcus_sp_KH32C_(nifA2Y1-544)</i>	468	TPVRS-----	-----SFG-----TVP IKQVPM-----	485	
<i>Mesorhizobium_japonicum_MAFF_303099/1-584</i>	489	YAVDE-----	-----FARGNMMPVGGP-----	505	
<i>Sinorhizobium_meliloti_102/1-542</i>	463	IEIDA-----	-----PAG-----TTPLLGAPANDV-----	482	
<i>Sinorhizobium_meliloti_SM1/1-542</i>	463	IEIDA-----	-----PAG-----TTPLLGAPANDV-----	482	
<i>Sinorhizobium_meliloti_Rm41/1-542</i>	463	IEIDA-----	-----PAG-----TTPLLGAPANDV-----	482	
<i>Sinorhizobium_meliloti_201/1-542</i>	463	IEIDA-----	-----PAG-----TTPLLGAPANDV-----	482	
<i>Sinorhizobium_medicae/1-542</i>	463	IATDA-----	-----SAG-----TTPLVGAPANDV-----	482	
<i>Sinorhizobium_fredii_NGR234/1-595</i>	515	HSLNG-----	-----LAMSRLPVESP-----	531	
<i>Sinorhizobium_fredii_HH103/1-557</i>	477	HSLNG-----	-----LTMSRRLPVESP-----	493	
<i>Sinorhizobium_fredii_USDA_257/1-595</i>	515	HSLNG-----	-----LTMSRRLPVESP-----	531	
<i>Rhizobium_etli_CIA_T_652/1-563</i>	469	ITVDG-----	-----HARSNVMTSSP-----	485	
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1_(nifA1Y1-586)</i>	492	NTISE-----	-----LARNNSIPAALP-----	508	
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1_(nifA2Y1-576)</i>	483	IKTLA-----	-----SAK-----TMPMLSPSSTEP-----	502	
<i>Rhizobium_leguminosarum_bv_viciae_384/1-520</i>	440	DAVHS-----	-----LNPRDTMSSGLG-----	456	
<i>Rhizobium_tropic/1-583</i>	488	KPIDE-----	-----LTRGGTTPAVSP-----	504	
<i>Bradyrhizobium_diazoeficiens_USDA_110/1-606</i>	516	P-----	-----AAPMQPVPAKSI-----	528	
<i>Bradyrhizobium_japonicum_USDA_6/1-583</i>	493	P-----	-----AAPMQPVPAKSI-----	505	
<i>Bradyrhizobium_sp_OR5_278/1-580</i>	491	PRGQP-----	-----MVPLPILPRTSA-----	507	
<i>Bradyrhizobium_sp_BTAl/1-581</i>	491	PRGQP-----	-----IVPLPILPRSSA-----	507	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_CGA009/1-585</i>	492	RPRP-----	-----EIPLQVLPRKAP-----	507	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_HaA2/1-584</i>	491	VRPRP-----	-----QIPLQVMPRKAP-----	507	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_BisA53/1-577</i>	489	QRPPP-----	-----EIPLEVAQLGPA-----	505	
<i>Azorhizobium_caulinodans/1-616</i>	519	PHVPP-----	-----APT-----LTPLSPAPLATA-----	539	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_2.4.1/1-582</i>	495	VGGLA-----	-----GGPLELPVLGSR-----	511	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17029/1-582</i>	495	VGGLA-----	-----GGPLELPVLGSR-----	511	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17025/1-583</i>	494	VGGLA-----	-----GGPLELPVLGSR-----	510	
<i>Gluconacetobacter_diaztrophicus_PAL_5_(Brazil)</i>	479	GRHPA-----	-----ASD-----VAGDTGAATELP-----	498	
<i>Pararhodospirillum_photometricum/1-604</i>	520	GGLA-----	-----HAPVTEADAPDP-----	535	
<i>Aquifex_aeolicus_(Nih1Y1-507)</i>	437	PEIRD-----	-----VKKESRIYNQTL-----	453	
<i>Hydrogenobacter_thermophilus/1-522</i>	461	HVVEE-----	-----KTKHEEKIIPK-----	476	



(ver legenda na página 203)

	610	620	630	640	650
<i>Herbaspirillum_seropedicae_SmR1</i> /1-543	479	-----	-----	-----	PSSPS 483
<i>Azospirillum_brasilense_Sp7</i> /1-625	518	ACASGC	-----	SAGPSPVCGAAQPVVPVPL	IPLPLPEPSAPA 554
<i>Azospirillum_brasilense_FP2</i> /1-626	518	ACASGC	-----	SAGPSPVCGAAQPVVPVPL	IPLPLPEPSAPA 554
<i>Azospirillum_sp._B510</i> /1-642	520	GTANGTPGGAG/MPACASGCGAGPLPVC	GASKPLPPSAIVPLPAPQPTTVA		569
<i>Azospirillum_lipoferum</i> /1-633	517	GVSNGT	-----	Q/MPACASGCSAGPAPVCGASKPLPPTA	IAPLPAPQPAA 560
<i>Rhodospirillum_rubrum_F11</i> /1-601	518	-----	-----	PGRGYAGPGESADSPSSPSAPPPAA	542
<i>Rhodospirillum_centenum</i> /1-558	487	-----	-----	-----	RPRPASPPPPP 498
<i>Rhodobacter_capsulatus</i> /1-583	512	-----	-----	-----	EPAPAPEP 519
<i>Rhodobacter_capsulatus</i> (2)/1-580	509	-----	-----	-----	EPAPAPEP 516
<i>Klebsiella_pneumoniae_342</i> /1-525	470	-----	-----	-----	AE 471
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ_(nifA1)</i> /1-523	462	-----	-----	-----	PLAAP-LPE 469
<i>Klebsiella_michiganensis_E718</i> /1-525	470	-----	-----	-----	TE 471
<i>Pseudomonas_stutzeri_DSM_4166</i> /1-522	462	-----	-----	-----	PLTPVPE 468
<i>Pseudomonas_stutzeri_A150</i> /1-522	462	-----	-----	-----	PLAPVPE 468
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ_(nifA2)</i> /1-486	432	-----	-----	-----	PSLAD 436
<i>Azotobacter_vinelandii_CA_(nifA2)</i> /1-486	432	-----	-----	-----	PSLAD 436
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6_(nifA2)</i> /1-486	432	-----	-----	-----	PSLAD 436
<i>Azotobacter_vinelandii_CA_(nifA1)</i> /1-523	462	-----	-----	-----	PLAAP 466
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6_(nifA1)</i> /1-523	462	-----	-----	-----	PLAAP 466
<i>Cupriavidus_taiwanensis</i> /1-544	485	-----	-----	-----	SARFALPSRND 495
<i>Burkholderia_vietnamiensis_G4</i> /1-570	482	-----	GDHRGLPRDGGFADDPFDDAFHEHEHDHDD		511
<i>Paraburkholderia_xenovorans_LB400</i> /1-573	482	-----	-----	PYGHHDLDAPSAPAAWGGTDPDAET	507
<i>Paraburkholderia_phymatum</i> /1-548	481	-----	-----	-----	SGHAADLNG 489
<i>Burkholderia_sp._KJ006</i> /1-572	482	-----	GDHRGLPRDGGFADDPFDDAFHEHEHDHDD		513
<i>Paraburkholderia_phenoliruptrix</i> /1-548	481	-----	-----	-----	SGHAADLNG 489
<i>Azoarcus_sp._BH72</i> /1-518	457	-----	-----	-----	PLRGG 461
<i>Azoarcus_sp._KH32C_(nifA1)</i> /1-553	477	-----	-----	APVSRPVSMAPSSAD	492
<i>Azoarcus_sp._KH32C_(nifA2)</i> /1-544	486	-----	-----	-----	PESAK 490
<i>Mesorhizobium_japonicum_MAFF_303099</i> /1-584	506	-----	-----	L PAMRVGPSQNEASPGETCDPNHPA	530
<i>Sinorhizobium_meliloti_102</i> /1-542	483	-----	-----	-----	PPKEPG 488
<i>Sinorhizobium_meliloti_SM11</i> /1-542	483	-----	-----	-----	PPKEPG 488
<i>Sinorhizobium_meliloti_Rm41</i> /1-542	483	-----	-----	-----	PPKEPG 488
<i>Sinorhizobium_meliloti_2011</i> /1-542	483	-----	-----	-----	PPKEPG 488
<i>Sinorhizobium_medicae</i> /1-542	483	-----	-----	-----	PPKDPA 488
<i>Sinorhizobium_fredii_NGR234</i> /1-595	532	-----	-----	-----	ASLGYPAGPG 541
<i>Sinorhizobium_fredii_HH103</i> /1-557	494	-----	-----	-----	VGLGYPNSPG 503
<i>Sinorhizobium_fredii_USDA_257</i> /1-595	532	-----	-----	-----	VGLGYPNSPG 541
<i>Rhizobium_etli_CIA_T_652</i> /1-563	486	-----	-----	-----	RSGGSIGASDEVSSVKACDPHSG 509
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1_(nifA1)</i> /1-586	509	-----	-----	-----	RSAGRTVAP-EDVSSVKACDPNSAG 532
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1_(nifA2)</i> /1-576	503	-----	-----	-----	RDTSTTEVPVAKHCDSNDPA 522
<i>Rhizobium_leguminosarum_bv_viciae_384</i> /1-520	457	-----	-----	-----	LYAGTPSGAT 466
<i>Rhizobium_tropicum</i> /1-583	505	-----	-----	-----	LSTQPGSVSHPEVAPFKACDPNGPA 529
<i>Bradyrhizobium_diazoefficiens_USDA_110</i> /1-606	529	-----	-----	-----	IPLAETAPPPQAV 541
<i>Bradyrhizobium_japonicum_USDA_6</i> /1-583	506	-----	-----	-----	IPLAETAPPPQAV 518
<i>Bradyrhizobium_sp._ORS_278</i> /1-580	508	-----	-----	-----	PIETPVDP 516
<i>Bradyrhizobium_sp._BTA1</i> /1-581	508	-----	-----	-----	PIEAPAESPA 517
<i>Rhodopseudomonas_palustris_CGA009</i> /1-585	508	-----	-----	-----	VEIVHPREPVASADDFAPAPVRS 531
<i>Rhodopseudomonas_palustris_HaA2</i> /1-584	508	-----	-----	-----	LEVYAPREAVSVSDPV 525
<i>Rhodopseudomonas_palustris_BisA53</i> /1-577	506	-----	-----	-----	EPRSVTPTRPA 516
<i>Azorhizobium_caulinodans</i> /1-616	540	-----	-----	-----	APAAASPAPAADSLPVTCPGTEA 562
<i>Rhodobacter_sphaeroides_2.4.1</i> /1-582	512	-----	-----	-----	PPAAAPSAPPPPPPT 526
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17029</i> /1-582	512	-----	-----	-----	PPAAAPSAPPPPPPT 526
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17025</i> /1-583	511	-----	-----	-----	PPTPAAPEGAAAPPASPA 528
<i>Gluconacetobacter_diazotrophicus_PAI_5_(Brazil)</i> /	499	-----	-----	-----	VLPAPRSSSQSSPGSSAAPDPAT 521
<i>Pararhodospirillum_photometricum</i> /1-604	536	-----	-----	-----	EPSDHGADFDPPTPPPS 552
<i>Aquifex_aeolicus_(Nih1)</i> /1-507		-----	-----	-----	
<i>Hydrogenobacter_thermophilus</i> /1-522		-----	-----	-----	

Conservation

-----000000

Consensus

+CA+G+PGGAGN++A++++AGP+P++GG+AP+PPP+AAPA+APPP+PPA

Occupancy



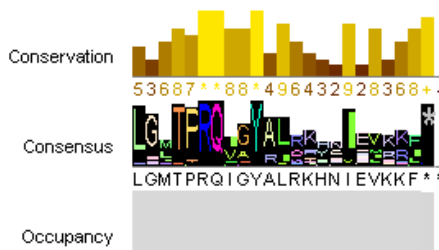
(ver legenda na página 203)

	660	670	680	690	700	
<i>Herbaspirillum_seropedicae_SmR1/1-543</i>	484 GMAKDKPLAAAPPT	-----	SERER	LWAMEQCQWVQAKAARL	520	
<i>Azospirillum_brasilense_Sp7/1-625</i>	555 AAAPPPSPAAAPPP	-AAEVPLDEPESGSLRDR	LLWAMERTG	WVQAKAARL	603	
<i>Azospirillum_brasilense_FP2/1-626</i>	555 AAAPPPSPAAAPPP	-AAEVPLDEPESGSLRDR	LLWAMERTG	WVQAKAARL	603	
<i>Azospirillum_sp_B510/1-642</i>	570 TPAVPSAPAPQPVAAGPDLPLDEPESGPLRDR	LWAMERTG	WVQAKAARL		619	
<i>Azospirillum_lipoferum/1-633</i>	561 AAPAVPSAPAPGPADTPDLPLDEPESGPLRDR	LWAMERTG	WVQAKAARL		610	
<i>Rhodospirillum_rubrum_F11/1-601</i>	543 APAAEDGEDESDA	-----	GQRER	LVHAMEKAGWVQAKAARL	578	
<i>Rhodospirillum_centenum/1-558</i>	499 APAPHAGHGSLTDE	-----	SEKER	LIGAMETAGWVQAKAARL	535	
<i>Rhodobacter_capsulatus/1-583</i>	520 APEAPPREEVPLRKTAKQ	-----	LSREE	LLRALESAGWVQAKAARL	560	
<i>Rhodobacter_capsulatus/2/1-580</i>	517 APEAPPREEVPLRKTAKQ	-----	LSREE	LLRALESAGWVQAKAARL	557	
<i>Klebsiella_pneumoniae_342/1-525</i>	472 DSWLDNSL	-----	DERGR	LIAALEKAGWVQAKAARL	502	
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ_(nifA1)/1-523</i>	470 VNLADETL	-----	DDRER	VIAALEQAGWVQAKAARL	500	
<i>Klebsiella_michiganensis_E718/1-525</i>	472 DSWLDNSL	-----	DERGR	LIAALEKAGWVQAKAARL	502	
<i>Pseudomonas_stutzeri_DSM_4166/1-522</i>	469 VNLADDSL	-----	DDRER	VIAALEQAGWVQAKAARL	499	
<i>Pseudomonas_stutzeri_A1501/1-522</i>	469 VDLADDSL	-----	DDRER	VIAALEQAGWVQAKAARL	499	
<i>Azotobacter_vinelandii_DJ_(nifA2)/1-486</i>	437 DGTL	-----	DDRER	LIAALEQAGWVQAKAARL	463	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA_(nifA2)/1-486</i>	437 DGTL	-----	DDRER	LIAALEQAGWVQAKAARL	463	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6_(nifA2)/1-486</i>	437 DGTL	-----	DDRER	LIAALEQAGWVQAKAARL	463	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA_(nifA1)/1-523</i>	467 LPEVNLADETL	-----	DDRER	VIAALEQAGWVQAKAARL	500	
<i>Azotobacter_vinelandii_CA6_(nifA1)/1-523</i>	467 LPEVNLADETL	-----	DDRER	VIAALEQAGWVQAKAARL	500	
<i>Cupriavidus_taiwanensis/1-544</i>	496 RPQ	-----	GERER	LWAMERCQWVQAKAARL	521	
<i>Burkholderia_vietnamiensis_G4/1-570</i>	512 AFAMNGDDEGKPE	-----	GERER	LWAMERCQWVQAKAARL	547	
<i>Paraburkholderia_xenovorans_LB400/1-573</i>	508 ELDPAADERAFAAASAGKPE	-----	GERER	LWAMERCQWVQAKAARL	550	
<i>Paraburkholderia_phymatum/1-548</i>	490 GRFDVPGGDGRPE	-----	GERER	LWAMERCQWVQAKAARL	525	
<i>Burkholderia_sp_KJ006/1-572</i>	514 AFAMNGDDEGKPE	-----	GERER	LWAMERCQWVQAKAARL	549	
<i>Paraburkholderia_phenoliruptrix/1-548</i>	490 GRFDVPGGDGRPE	-----	GERER	LWAMERCQWVQAKAARL	525	
<i>Azoarcus_sp_BH72/1-518</i>	462 GGTVDLDDPGL	-----	DERER	VIAALEQAGWVQAKAARL	495	
<i>Azoarcus_sp_KH32C_(nifA1)/1-553</i>	493 EVEAPQAVERRGVPM	-----	GERDR	LYDAMERCQWVQAKAARL	530	
<i>Azoarcus_sp_KH32C_(nifA2)/1-544</i>	491 APQSPDL	-----	SERDT	LLWALEQSGVQAKAARL	521	
<i>Mesorhizobium_japonicum_MAFF_303099/1-584</i>	531 CPAINGRL	-----	TERDR	LIDAMEKAGWVQAKAARL	561	
<i>Sinorhizobium_meliloti_102/1-542</i>	489 SAGVASNL	-----	IERDR	LISALEEAGWVQAKAARL	519	
<i>Sinorhizobium_meliloti_SM11/1-542</i>	489 SAGVASNL	-----	IERDR	LISALEEAGWVQAKAARL	519	
<i>Sinorhizobium_meliloti_Rm41/1-542</i>	489 SAGVASNL	-----	IERDR	LISALEEAGWVQAKAARL	519	
<i>Sinorhizobium_meliloti_2011/1-542</i>	489 SAGVASNL	-----	IERDR	LISALEEAGWVQAKAARL	519	
<i>Sinorhizobium_medicae/1-542</i>	489 SAGAASNL	-----	IERDR	LISALEEAGWVQAKAARL	519	
<i>Sinorhizobium_fredii_NGR234/1-595</i>	542 GLTVAPHL	-----	SDREL	LISAMEKAGWVQAKAARL	572	
<i>Sinorhizobium_fredii_HH103/1-557</i>	504 DLTVPAPNL	-----	TNREL	LISAMEKAGWVQAKAARL	534	
<i>Sinorhizobium_fredii_USDA_257/1-595</i>	542 DLTVPAPNL	-----	TNREL	LISAMEKAGWVQAKAARL	572	
<i>Rhizobium_etli_CIAT_652/1-563</i>	510 CPAMESRL	-----	TQRDR	LIDAMEKAGWVQAKAARL	540	
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586</i>	533 CPAMESRL	-----	TQRDR	LIDAMEKAGWVQAKAARL	563	
<i>Rhizobium_etli_bv_mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576</i>	523 RPTMSPCA	-----	TTRDR	LIDAMEKAGWVQAKAARL	553	
<i>Rhizobium_leguminosarum_bv_viciae_3841/1-520</i>	467 ATMEAPGL	-----	TERDR	LINAMVYKAGWVQAKAARL	497	
<i>Rhizobium_tropic/1-583</i>	530 CPALSPRL	-----	TERDR	LIEAMEKVAGWVQAKAARL	560	
<i>Bradyrhizobium_diazoeficiens_USDA_110/1-606</i>	542 CEPGLSLAPSGTVLVSGARM	-----	ADRER	VVAAMEKSGWVQAKAARL	583	
<i>Bradyrhizobium_japonicum_USDA_6/1-583</i>	519 CEPGLSLAPSGTVLVSGARM	-----	ADRER	VVAAMEKSGWVQAKAARL	560	
<i>Bradyrhizobium_sp_ORS_278/1-580</i>	517 AVEADDGEYSEAMDGGAV	-----	PERER	IVQAMERSGWVQAKAARL	557	
<i>Bradyrhizobium_sp_BT11/1-581</i>	518 AVDIDEGEYSEMSDGGAV	-----	PERER	IVQAMERSGWVQAKAARL	558	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_CGA009/1-585</i>	532 MPSDESNM	-----	SERER	LINAMERAGWVQAKAARL	562	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_HaA2/1-584</i>	526 TPMSAESANGGPM	-----	SERER	LYNAMERSGWVQAKAARL	561	
<i>Rhodopseudomonas_palustris_BisA53/1-577</i>	517 VVSPAPSREAPSDDL	-----	SERDR	LIDAMERTG	WVQAKAARL	554
<i>Azorhizobium_caulinodans/1-616</i>	563 CPAVPPRQ	-----	SEKEQL	LQAMERSGWVQAKAARL	593	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_2.4.1/1-582</i>	527 VPSAPLDGEA	-----	AEREAL	LIEAMERAGWVQAKAARL	559	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17029/1-582</i>	527 VPSAPLDGEA	-----	AEREAL	LIEAMERAGWVQAKAARL	559	
<i>Rhodobacter_sphaeroides_ATCC_17025/1-583</i>	529 RPAPLDSEA	-----	AEREAL	LIEAMERAGWVQAKAARL	560	
<i>Gluconacetobacter_diazotrophicus_PA1_5_(Brazil)</i>	522 CPSSAVCSAAQGEWS	-----	PQRDEL	LIEAMETAGWVQAKAARL	559	
<i>Pararhodospirillum_photometricum/1-604</i>	553 CDEAEP	-----	EERAR	LIAAMEKAGWVQAKAARL	581	
<i>Aquifex_aeolicus_(Nih1)/1-507</i>	454 --NGETIWD	-----	LEKQL	IEKALEESGFVIEKAAKK	483	
<i>Hydrogenobacter_thermophilus/1-522</i>	477 -----	DEKTK	IEVLERVGVYVQAKAARL		499	



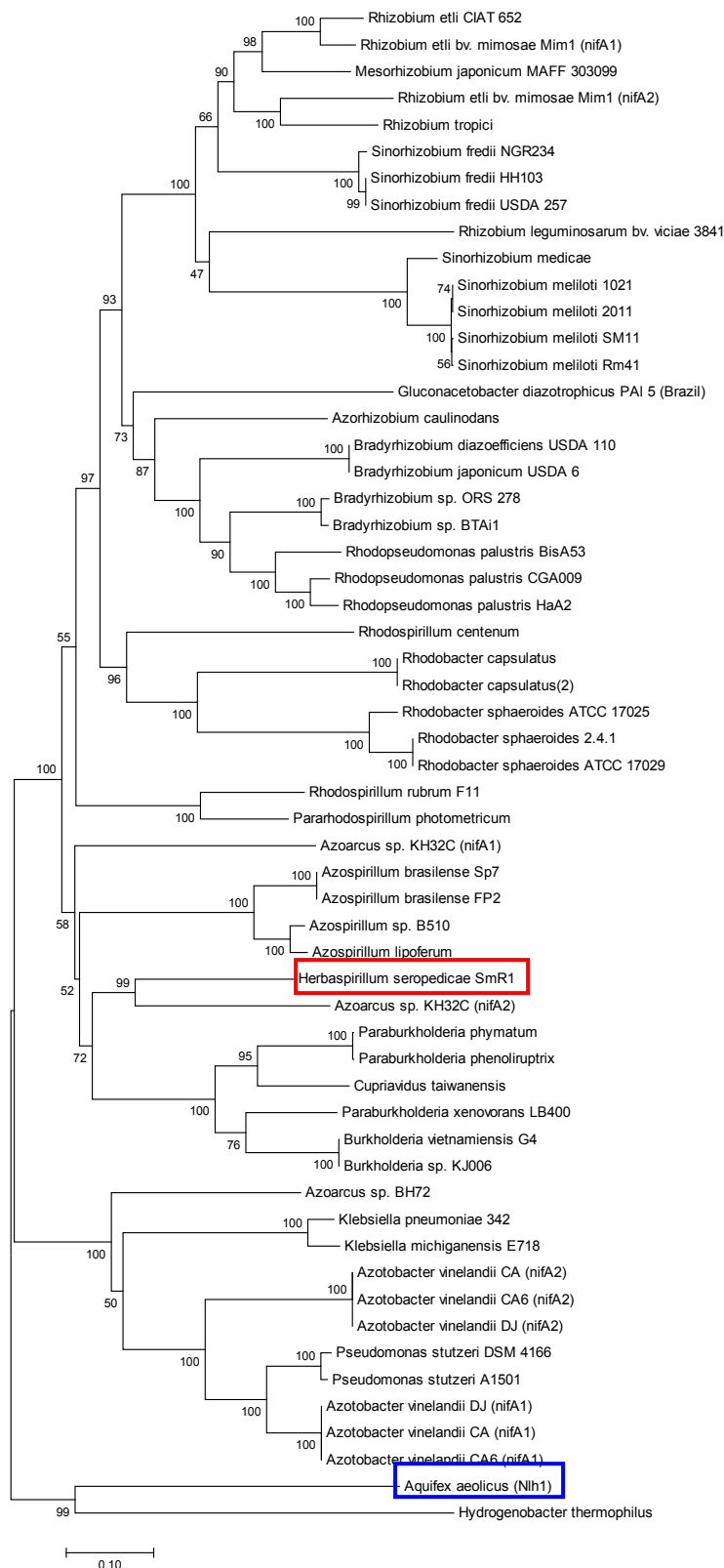
(ver legenda na página 203)

		710	720	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> _SmR1/1-543	521	LNISPRQMGYALQKFN	EVKKKF*	543
<i>Azospirillum brasilense</i> _Sp7/1-625	604	LGMTTRQVSYALRKYN	EIKRF*	625
<i>Azospirillum brasilense</i> _FP2/1-626	604	LGMTTRQVSYALRKYN	EIKRF*	626
<i>Azospirillum</i> _sp._B510/1-642	620	LGMTTRQVSYALRKYN	EIKRF*	642
<i>Azospirillum lipoferum</i> /1-633	611	LGMTTRQVSYALRKYN	EIKRF*	633
<i>Rhodospirillum rubrum</i> _F11/1-601	579	LGMTTPRQIGYALKKHD	PLKRM*	601
<i>Rhodospirillum centenum</i> /1-558	536	LGLTPRQIGYALRKHG	EVQRF*	558
<i>Rhodobacter capsulatus</i> /1-583	561	LGMTTPRQIAYALQKFE	ELRKI*	583
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (2Y)/1-580	558	LGMTTPRQIAYALQKFE	ELRKI*	580
<i>Klebsiella pneumoniae</i> _342/1-525	503	LGMTTPRQVAYRIQIMD	ITLPR*	525
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA1)/1-523	501	LGMTTPRQIAYRIQTLN	IHMRI*	523
<i>Klebsiella michiganensis</i> _E718/1-525	503	LGMTTPRQVAYRIQIMD	ITMPL*	525
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _DSM_4166/1-522	500	LGMTTPRQIAYRVQTLN	IHMRI*	522
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _A1501/1-522	500	LGMTTPRQIAYRVQTLN	IHMRI*	522
<i>Azotobacter vinelandii</i> _DJ_(nifA2)/1-486	464	LGMTTPRQVAYRIQTLN	ICMQK*	486
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA2)/1-486	464	LGMTTPRQVAYRIQTLN	ICMQK*	486
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA2)/1-486	464	LGMTTPRQVAYRIQTLN	ICMQK*	486
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA_(nifA1)/1-523	501	LGMTTPRQIAYRIQTLN	IHMRI*	523
<i>Azotobacter vinelandii</i> _CA6_(nifA1)/1-523	501	LGMTTPRQIAYRIQTLN	IHMRI*	523
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> /1-544	522	LGITPRQIGYALRKNG	ELRRF*	544
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> _G4/1-570	548	LKITPRQIGYALHKYG	EVRRF*	570
<i>Paraburkholderia xenovorans</i> _LB400/1-573	551	LGITPRQMGYALHKYA	EVRRF*	573
<i>Paraburkholderia phymatum</i> /1-548	526	LGITPRQIGYALRKHE	EVRRF*	548
<i>Burkholderia</i> _sp._KJ006/1-572	550	LKITPRQIGYALHKYG	EVRRF*	572
<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> /1-548	526	LGITPRQIGYALRKHE	EVRRF*	548
<i>Azoarcus</i> _sp._BH72/1-518	496	LGMTTPRQIAYRIQTLN	IKVRQ*	518
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA1)/1-553	531	LGLTPRQIGYALRKYN	EVKKL*	553
<i>Azoarcus</i> _sp._KH32C_(nifA2)/1-544	522	LNLSPRQFGYALQKHE	IRVKKF*	544
<i>Mesorhizobium japonicum</i> _MAFF_303099/1-584	562	LGLTPRQVGYALRRHH	EVKKF*	584
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _102/1-542	520	LEKTPRQVGYALRRHGV	DVRKL*	542
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _SM1/1-542	520	LEKTPRQVGYALRRHGV	DVRKL*	542
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _Rm41/1-542	520	LEKTPRQVGYALRRHGV	DVRKL*	542
<i>Sinorhizobium meliloti</i> _2011/1-542	520	LEKTPRQVGYALRRHGV	DVRKL*	542
<i>Sinorhizobium medicae</i> /1-542	520	LEKTPRQVGYALRRHGV	DVRKL*	542
<i>Sinorhizobium fredii</i> _NGR234/1-595	573	LGLTPRQVGYALRRHH	IQVKKI*	595
<i>Sinorhizobium fredii</i> _HH103/1-557	535	LGLTPRQVGYALRRHG	IQVKKI*	557
<i>Sinorhizobium fredii</i> _USDA_257/1-595	573	LGLTPRQVGYALRRHG	IQVKKI*	595
<i>Rhizobium etli</i> _CIAT_652/1-563	541	LGLTPRQVGYALRQHR	EVKKL*	563
<i>Rhizobium etli</i> _bv._mimosae_Mim1_(nifA1)/1-586	564	LGLTPRQVGYALRQHR	EVKKL*	586
<i>Rhizobium etli</i> _bv._mimosae_Mim1_(nifA2)/1-576	554	LGLTPRQIGYALRQHQ	EVKKF*	576
<i>Rhizobium leguminosarum</i> _bv._viciae_384/1-520	498	LGKTPRQVGYALRRFR	IDVKK*	520
<i>Rhizobium tropici</i> /1-583	561	LGLTPRQVGYALRRHN	EMKKF*	583
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> _USDA_110/1-606	584	LGLTPRQVGYALRKYG	EIKRF*	606
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> _USDA_6/1-583	561	LGLTPRQVGYALRKYG	EIKRF*	583
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._ORS_278/1-580	558	LGLTPRQIGYALKKYN	EVKRF*	580
<i>Bradyrhizobium</i> _sp._BTai/1-581	559	LGLTPRQIGYALKKYN	EVKRF*	581
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _CGA009/1-585	563	LGLTPRQIGYALKKHN	ELKHF*	585
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _HaA2/1-584	562	LGLTPRQIGYALKKYD	ELKHF*	584
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> _BisA53/1-577	555	LGLTPRQIGYALKKHD	EVKHF*	577
<i>Azorhizobium caulinodans</i> /1-616	594	LNLTPRQVGYALRKYD	IDIKRF*	616
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _2.4.1/1-582	560	RGMTTPRQIGYALKKYN	IRVEKF*	582
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17029/1-582	560	RGMTTPRQIGYALKKYN	IRVEKF*	582
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> _ATCC_17025/1-583	561	RGMTTPRQIGYALRKHN	IRVEKF*	583
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> _PAL_5_(Brazil)/1-604	560	LGLTPRQIGYALRKNG	ISIKKF*	584
<i>Pararhodospirillum photometricum</i> /1-604	582	LGMTTPRQIGYALKKHD	PLKRL*	604
<i>Aquifex aeolicus</i> _(Nih1)/1-507	484	LGMTTPRQVSYRIQKYG	IKLPKK*	507
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> /1-522	500	LGMTTVRGLNRYIKKYG	IEIKKI*	522



(ver legenda na página 203)

APÊNDICE 2 – ÁRVORE DE PROXIMIDADE DE SEQUÊNCIA ENTRE PROTEÍNAS NifA DE DIVERSOS ORGANISMOS



Árvore de proximidade de sequência de 56 proteínas NifA de proteobactérias construída pelo método de *neighbor-joining*. Os valores sobre os ramos indicam o grau de suporte (em porcentagem) de cada dicotomia calculado pelo método de *bootstrap*. Em **vermelho**, proteína NifA de *H. seropedicae*; em **azul**, proteína Nih1 de *A. aeolicus*.

APÊNDICE 3 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE his-hs409-417av[xhoI] CALCULADOS COM O PROGRAMA PROTPARAM

User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MATILDDRSV NLELVTIYEI SKILGSSLDL SKTLREVLNV

      70      80      90     100     110     120
LSAHLETKRV LLSLMQDSGE LQLVSAIGLS YEEFQSGRYR VEGEGITGKIF QTETPIVVRD

     130     140     150     160     170     180
LAQEPLFLAR TSPRQSQDGE VISFVGVPK AAREMLGVLC VFRDQGSPSR SVDHEVRLLT

     190     200     210     220     230     240
MVANLIGQTV RLYRSVAAER QQLQEEKRQL SRQLQGKYKL DNVIGISKAM QEVFAQVHQ S

     250     260     270     280     290     300
APSRSTMLLR GESGTGKEVI ARAIHLYSPR KDGPFIKVN AALSETLLES ELFGHEKGAF

     310     320     330     340     350     360
TGAQGERKGR FELAHGGTLF LDEIGEISPA FQAKLLRVLQ EREFERVGG SRSIKVDVRLV

     370     380     390     400     410     420
TATNRDLEKA VAKGEFRADL YYRINVVSIF IPPLRERRED IPYLVEHFLE KFRVENQRAM

     430     440     450     460     470     480
VAMSPQAMLL MSHRWPGNVR ELENCLERSA IMSEDGTITR DVVSLTGVDN ESPPLAAPLP

     490     500     510     520     530
EVNLADETL DRRERVIAALE QAGWVQAKAA RLLGMTPRQI AYRIQTLNIH MRKI

```

Number of amino acids: 534

Molecular weight: 59748.57

Theoretical pI: 7.81

Amino acid composition:

Ala (A)	40	7.5%
Arg (R)	47	8.8%
Asn (N)	13	2.4%
Asp (D)	21	3.9%
Cys (C)	3	0.6%
Gln (Q)	27	5.1%
Glu (E)	46	8.6%
Gly (G)	37	6.9%
His (H)	16	3.0%
Ile (I)	30	5.6%
Leu (L)	62	11.6%
Lys (K)	21	3.9%
Met (M)	14	2.6%
Phe (F)	17	3.2%
Pro (P)	20	3.7%
Ser (S)	42	7.9%

Thr (T)	23	4.3%
Trp (W)	2	0.4%
Tyr (Y)	10	1.9%
Val (V)	43	8.1%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 67

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 68

Atomic composition:

Carbon	C	2628
Hydrogen	H	4276
Nitrogen	N	770
Oxygen	O	784
Sulfur	S	17

Formula: C₂₆₂₈H₄₂₇₆N₇₇₀O₇₈₄S₁₇

Total number of atoms: 8475

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient	26025
Abs 0.1% (=1 g/l)	0.436, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient	25900
Abs 0.1% (=1 g/l)	0.433, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, *in vitro*).
 >20 hours (yeast, *in vivo*).
 >10 hours (*Escherichia coli*, *in vivo*).

Instability index:

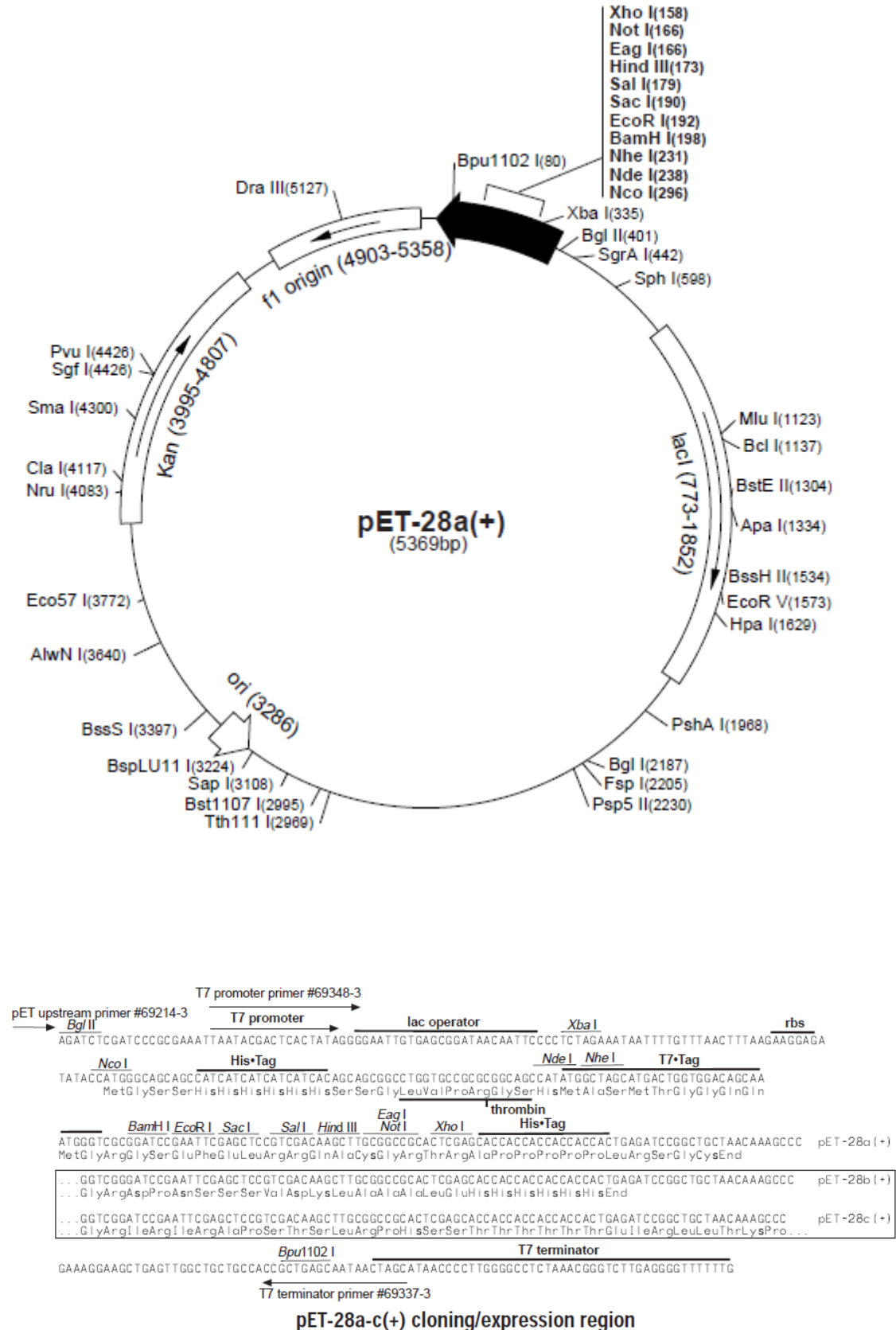
The instability index (II) is computed to be 42.89
 This classifies the protein as unstable.

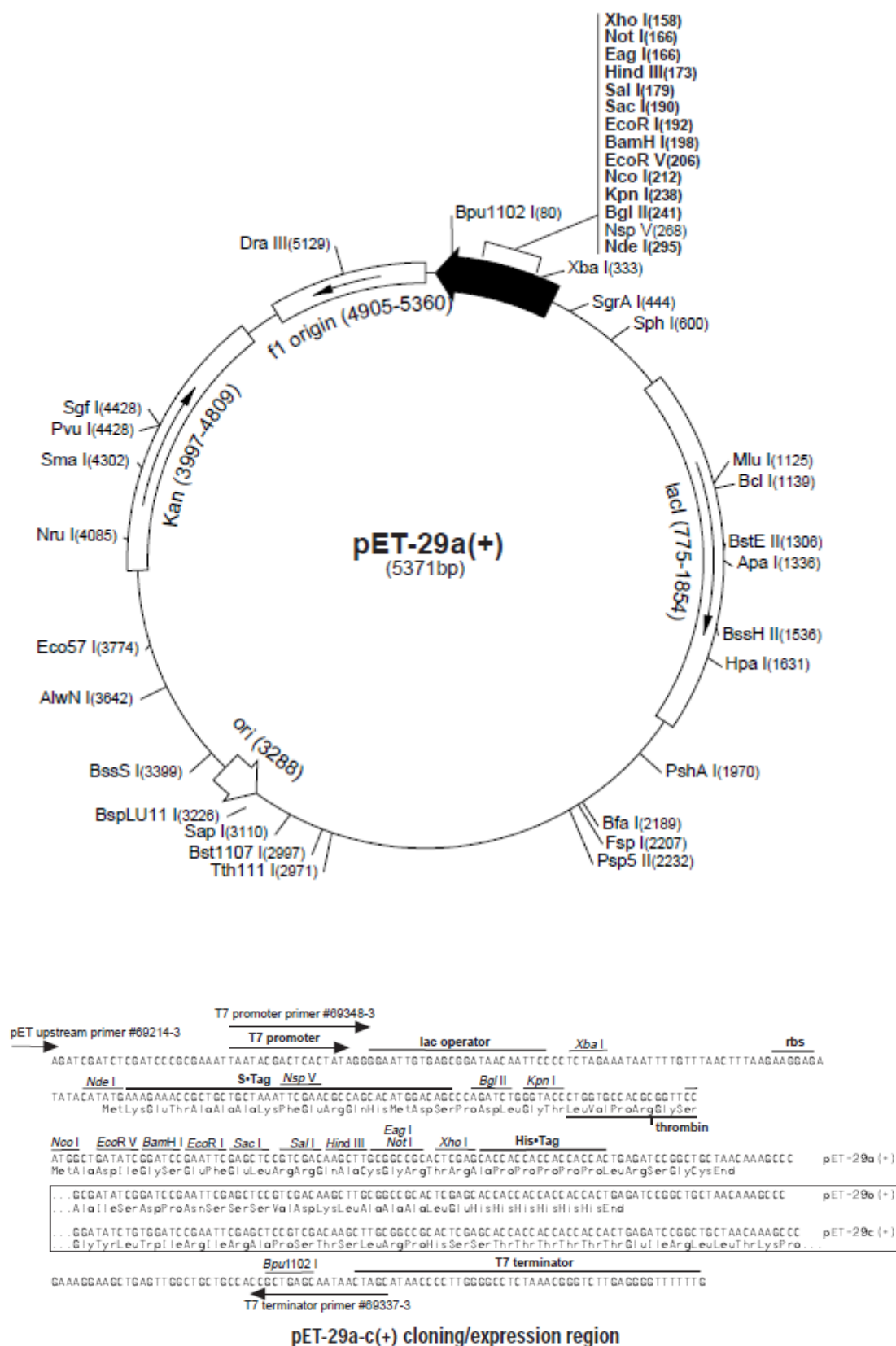
Aliphatic index: 98.03

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.235

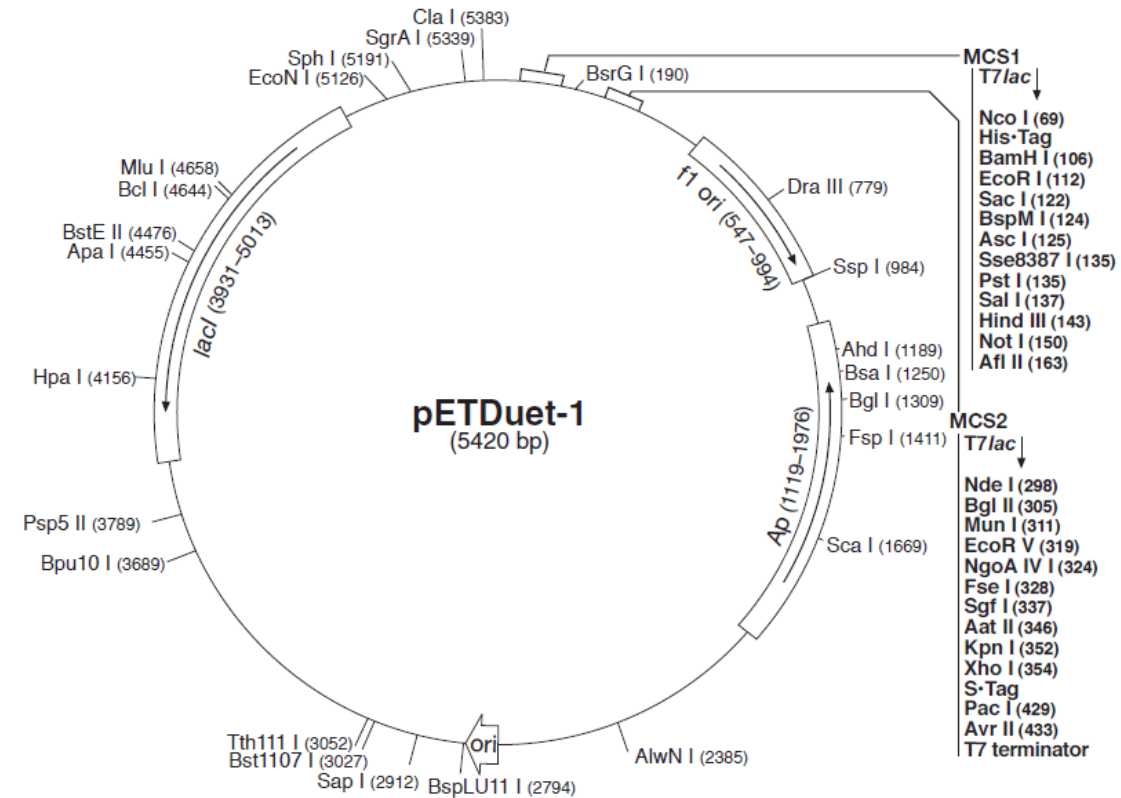
ANEXOS – MAPAS PLASMIDIAIS

ANEXO 1 – MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pET28a





ANEXO 3 – MAPA DO VETOR DE EXPRESSÃO pETDuet1



pETDuet-1 cloning/expression regions

ANEXO 4 – MAPA DO VETOR DE CLONAGEM pTZ57R/T

