GISELI KLASSEN

# ANÁLISE GENÉTICA E FUNCIONAL DOS GENES nifENXorf1orf2, nifQmodABCfixXC DE Herbaspirillum seropedicae

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA 2000

## **GISELI KLASSEN**

## ANÁLISE GENÉTICA E FUNCIONAL DOS GENES nifENXorf1orf2, nifQmodABCfixXC DE Herbaspirillum seropedicae

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pela comissão formada pelos professores:

Prof<sup>a</sup>. Dra Liu Un Rigo Piga

Orientadora :

Depto de Bioquímica – UFPR

Enonuel M. or My.

Prof. Emanuel Maltempi de Souza Depto de Bioquímica – UFPR

Advinop lookenny Prof<sup>a</sup>. Dra Adriana Hemerly Depto de Bioquímica Médica - UFRJ

Prof<sup>a</sup>. Dra Irene Silveira Schrank

Centro de Biotecnologia - UFRGS

1 Juie Anne Van Seup

Prof<sup>4</sup>. Dra Marie-Anne Van Sluys Depto de Botânica - USP

Curitiba, 04 de maio de 2000.

Orientadores:

Dra. Liu Un Rigo Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço as pessoas que tiveram um papel essencial no desenvolvimento deste trabalho:

Em primeiro lugar agradeço a Professora Liu Un Rigo e ao Professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela orientação dessa tese e mais do que isso pelo carinho e atenção recebidos no decorrer deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e a todos os professores do Departamento de Bioquímica.

Em especial as Professoras, Maria Benigna M. de Oliveira e Glaci T. Zancan pelo exemplo e valiosa contribuição acadêmica.

Ao Departamento de Patologia Básica, por propiciar condições para o andamento desse trabalho, em especial ao Professor Nizan P. Almeida.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica em especial a Marilza e a Ivone.

Às bibliotecárias Isabela Fernandes e Ruth Lobo dos Santos, pela colaboração e atenção dispensada.

Ao Conselho Nacional de Ensino e Pesquisa-CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Dr. Geoffrey M. Yates, por suas sugestões e carinho.

Ao Professor Emanuel Maltempi de Souza pela valiosa contribuição para este trabalho e pela amizade e carinho recebidos.

Às Professoras Leda S. Chubatsu e Maria Berenice R. Steffens pelas sugestões e apoio.

À Roseli Prado, Dona Julieta, Valter e Ademir pela atenção e carinho.

Aos amigos do Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio, pelo companheirismo e amizade, Elaine, Maria Lucia, Darlene, Fabiane, Cyntia,

iii

Leonardo, Roseli, Rose Adele, Josiane, Eduardo, Claudia, Humberto, Juliana Ramos, Adriana, Raquel, Lauren, Juliana Inaba, Igor, Luiza, Lilian, Mariana, Luciano, Carolina, Ana Cláudia, Fernando, Juliana, Patrícia.

Aqueles cujo carinho e amor foram essenciais em todos o momentos, incentivando, apoiando e tornado o caminho percorrido suave e feliz:

Elaine, Darlene, Sandra, Maria Lucia, Fabiane, Rose Adele, Cyntia, Eneida, Janyce.

Com muito amor agradeço pela força, incentivo, companheirismo e amor ao

Pedro

Rubens e LiLiane

Meus pais Valter e Iracy

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS vi			viii
LISTA DE TABELAS			x
AB	REAVIA	ATURAS	xi
RE	SUMO.		xii
AB	STRAC	тт	xiii
1.	INTR	ODUÇÃO	1
	1.1.	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	1
	1.2.	O COMPLEXO NITROGENASE	2
		1.2.1. Proteína Ferro	2
		1.2.2. Proteína MoFe	3
		1.2.3. Mecanismos de proteção da nitrogenase contra o	
		oxigênio	4
		1.2.4. Proteínas carreadoras de elétrons para a nitrogenase	5
		1.2.5. Redução do nitrogênio pelo complexo nitrogenase	6
	1.3.	NITROGENASES ALTERNATIVAS	8
	1.4.	GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	9
	1.5.	BIOSSÍNTESE E INSERÇÃO DO FeMoco	15
	1.6.	GENES mod	18
	1.7.	REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	22
		1.7.1. Regulação da transcrição dos genes nif em K.	
		pneumoniae	22
	1.8.	Herbaspirillum seropedicae	23
	1.9.	OBJETIVOS	26
2.	MATE	RIAL E MÉTODOS	27
	2.1.	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	27
	2.2.	REAGENTES	29
	2.3.	MEIOS DE CULTIVO	29
	2.4.	ANTIBIÓTICOS	32
	2.5.	CONDIÇÕES DE CULTIVO	32
	2.6.	ATIVIDADE DA NITROGENASE	33
		2.6.1. Atividade da nitrogenase em meio líquido	33
		2.6.2. Atividade da nitrogenase em meio semi-sólido	33

	2.7.	DOSAGEM DE PROTEÍNAS 3		
	2.8.	ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE	34	
	2.9.	DOSAGEM DE NITRITO	35	
	2.10.	MANIPULAÇÃO DE DNA	35	
	2.11.	PURIFICAÇÃO DE DNA DE BACTERIÓFAGO $\lambda$ RECOMBINANTE	35	
	2.12.	PURIFICAÇÃO DE DNA DE <i>H. seropedicae</i>	35	
	2.13.	TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS EM BACTÉRIAS	36	
		2.13.1. <i>E. coli</i>	36	
		2.13.2. <i>H. seropedicae</i>	36	
	2.14.	HIBRIDIZAÇÃO DE DNA	37	
		2.14.1 Hibridização em placa	37	
		2.14.2 Hibridização de DNA separado por eletroforese em gel		
		de agarose	38	
	2.15.	SEQUENCIAMENTO DE DNA	39	
		2.15.1. Deleções	39	
		2.15.2. Preparo de DNA de fita dupla	39	
		2.15.3. Reação de sequenciamento	39	
		2.15.4. Edição e análise das sequências	40	
	2.16.	OBTENÇÃO DE MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i>	41	
		2.16.1. Mutante <i>nifN</i>	41	
		2.16.2. Mutante <i>nifX</i>	42	
		2.16.3. Mutante na <i>orf</i> 1	42	
		2.16.4. Mutante <i>nifQ</i>	43	
		2.16.5. Mutante <i>modA</i>	43	
	2.17.	CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA ESTUDOS DE		
		COMPLEMENTAÇÃO	44	
	2.18.	ANALISE DE POSSIVEIS REGIOES PROMOTORAS	44	
		2.18.1. Análise da região intergênica nifK-nifE	44	
		2.18.2. Análise da região intergênica <i>nifQ-modA</i>	45	
3.	RESU		46	
	3.1.	ISOLAMENTO, DE BACTERIOFAGO RECOMBINANTE CONTENDO		
		A REGIAO A JUSANTE DOS GENES nifHDK DE H. seropedicae	46	
	3.2.	SUBCLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO A		
	REGIAO A JUSANTE DOS GENES <i>nifHDK</i> DE <i>H. seropedicae</i>	48		
3.3. SEQUENCIAMENTO DOS GENES nifENXorf1orf2				
		3.3.1. Genes nifEN	49	

5.	REFE	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
4.	CONC	LUSÕES	103
		FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM DIVERSOS DIAZOTROFOS	100
	3.9.	ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE GENES ENVOLVIDOS COM A	
		3.8.2. Mutante nifQ	92
		3.8.1. Mutante modA	91
	3.8.	MUTAGÊNESE DOS GENES nifQ E modA DE H. seropedicae	91
	3.7.	ANÁLISE DA REGIÃO INTERGÊNICA nifQ-modA	89
		<i>3.6.5.</i> Genes <i>fixXC</i>	89
		<i>3.6.4.</i> Gene modC	87
		<i>3.6.3.</i> Gene <i>modB</i>	84
		<i>3.6.2.</i> Gene <i>modA</i>	80
		<i>3.6.1.</i> Gene <i>nifQ</i>	75
	3.6.	SEQUENCIAMENTO DOS GENES nifQmodABCfixXC	75
		3.5.3. Mutante na orf1	68
		3.5.2. Mutante nifX	67
		3.5.1. Mutante nifN	66
	3.5.	MUTAGÊNESE DOS GENES <i>nifN</i> , <i>nifX</i> e <i>orf1</i> de <i>H. seropedicae</i> .	66
	3.4.	ANÁLISE DA REGIÃO INTERGÊNICA nifK-nifE DE H. seropedicae	65
		3.3.3. orf1orf2	63
		<i>3.3.2.</i> Gene <i>nifX</i>	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de oxidação-redução da nitrogenase	7
Figura 2. Organização estrutural e função dos genes nif em K. pneumoniae	14
Figura 3. Biossíntese e inserção do FeMoco na apoproteína MoFe	17
Figura 4. Organização de operons mod em diversos organismos	21
Figura 5. Localização de fragmentos de DNA do fago $\lambda$ GK10 contendo os	
genes nifDK de H. seropedicae	47
Figura 6. Mapa de restrição da região a jusante dos genes nifHDK em H.	
seropedicae	48
Figura 7. Sequência de nucleotídeos dos genes nifK (região-3')	
nifENXorf1orf2 de H. seropedicae	53
Figura 8. Identificação das prováveis regiões codificadoras de proteínas a	
jusante dos genes <i>nifHDK</i> de <i>H. seropedicae</i>	54
Figura 9. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifD e	
NifE de <i>H. seropedicae</i> (HSNifD e HSNifE) e NifE de <i>B. japonicum</i>	
(BJNifE)	56
Figura 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifK	
e NifN de <i>H. seropedicae</i> (HSNifK e HSNifN) e NifN de <i>B.</i>	
japonicum (BJNifN)	58
Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifX	
de H. seropedicae (HSNifX), R. capsulatus (RCNifX), A.	
vinelandii (AVNifX) e K. pneumoniae (KPNifX)	60
Figura 12. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifX	
(HSNifX) e NifB (HSNifB) de <i>H. seropedicae</i>	61
Figura 13. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifX	
de H. seropedicae (HSNifX), NifY de A. vinelandii (AVNifY) e	
NifY de K. pneumoniae (KPNifY)	62
Figura 14. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas	
ORF1 de H. seropedicae (HSORF1) ORF4 de R. capsulatus	
(RCORF4) e ORF3 de <i>A. vinelandii</i> (AVORF3)	64
Figura 15. Mapa físico e genético dos genes nifHDKENXorf1or2 em H.	
seropedicae	70
Figura 16. Efeito da concentração de Fe <sup>2+</sup> sobre a atividade da	
nitrogenase das estirpes mutantes GK10 e GK22	72

Figura 17. Efeito da concentração de Fe <sup>2+</sup> sobre a expressão dos genes	
nifHD::lacZ e orf1::lacZKm de H. seropedicae	74
Figura 18. Sequência de nucleotídeos dos genes nifQ (região 3')	
modABCfixXC de H. seropedicae	77
Figura 19A. Identificação das prováveis regiões codificadoras de proteínas	
dos genes nifQmodABC de H. seropedicae	78
Figura 19B. Identificação de prováveis regiões codificadoras de proteínas	
dos genes fixCX de H. seropedicae	79
Figura 20. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas	
ModA de H. seropedicae (HSModA), R. capsulatus (RCModA), E.	
coli (ECModA) e A. vinelandii (AVModA)	83
Figura 21. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas	
ModB de H. seropedicae (HSModB), R. capsulatus (RCModB),	
<i>E. coli</i> (ECModB) e <i>A. vinelandii</i> (AVModB)	85
Figura 22. Hélices transmembrana das proteínas ModB de H. seropedicae,	
E. coli , R. capsulatus e A. vinelandii	86
Figura 23. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas	
ModC de H. seropedicae (HSModC), R. capsulatus (RCModC), E.	
coli (ECModC), e A. vinelandii (AVModC)	88
Figura 24. Mapa físico e genético dos genes nifQmodABCfixXC em H.	
seropedicae	94
Figura 25. Atividade da nitrogenase nas estirpes selvagem SMR1 e	
mutantes GK60 e GK55 de H. seropedicae	95
Figura 26. Efeito da concentração de molibdato de sódio na atividade da	
nitrogenase em estirpes SMR1 e GK60 de H. seropedicae	96
Figura 27. Expressão dos genes nifHD::lacZ de H. seropedicae nas estirpes	
SMR1 e GK60, em condições limitantes de molibdênio	97
Figura 28. Curva de crescimento das estirpes SMR1, GK60 e GK55 de $H$ .	
seropedicae, em meio contendo nitrato como fonte de	
nitrogênio	98
Figura 29. Determinação da produção de nitrito pelas estirpes SMR1,	
GK60, GK55 de H. seropedicae	99
Figura 30. Organização estrutural de genes envolvidos com a fixação de	
nitrogênio em diversos diazotrofos	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias e Plasmídeos27
Tabela 2. Atividade de β-galactosidase em estirpes de <i>H. seropedicae</i> e <i>E. coli</i> 71
Tabela 3. Atividade da nitrogenase das estirpes mutantes nifN, nifX e   orf1 de H. seropedicae73

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	-	adenosina difosfato
Amp	-	ampicilina
АТР	-	adenosina trifosfato
bp	-	pares de base nucleotídicas
Cm	-	cloranfenicol
kb	-	quilopares de base nucleotídicas
KDa	-	quilodalton
Km	-	canamicina
ORF	-	sequência potencialmente codificadora de
		proteína. Do inglês open reading frame
rpm	-	rotações por minuto
Sm	-	estreptomicina
Тс	-	tetraciclina
UAS	-	sequência para ligação de proteína ativadora
		localizada a montante de um gene. Do inglês
		upstream acitivator sequence

#### RESUMO

Os genes a jusante dos genes nifHDK de H. seropedicae foram isolados de um banco genômico construído no vetor  $\lambda$ EMBL3 (MACHADO *et al.*, 1996) com uma sonda de DNA contendo os genes nifDK de H. seropedicae. Um bacteriófago recombinante denominado  $\lambda$ GK10, foi isolado e fragmentos de DNA subclonados foram sequenciados. A jusante dos genes nifHDK um fragmento de DNA SalI-EcoRI de 1,2 kb continha a região 3' do gene nifK e a região 5' do gene nifE. A região intergênica não contém seguência homóloga à sequência consenso de promotores *nif* ou de qualquer outro promotor conhecido. Um fragmento contíguo ao anterior EcoRI de 4,0 kb contém a região 3' do gene nifE e os genes nifNXorf1orf2. Nenhuma atividade de promotor foi identificada em toda região sequenciada. Estudos de complementação e fusão lacZ sugerem que os genes nifHDKENXorf1orf2 constituem um único operon regulado por oxigênio e amônia sob o controle do promotor do gene nifH. Mutagênese nos genes nifN, nifX e orf1 mostraram que o gene nifN é essencial para fixação de nitrogênio em H. seropedicae. Similarmente os genes nifX e orf1 se revelaram essenciais para atividade da nitrogenase em condições limitantes de ferro. Um fragmento EcoRI-SalI de 3,7 kb localizado à aproximadamente 3 kb desta região foi isolado, sequenciado e revelou a presença dos genes nifQmodABCfixXC. Mutantes por inserção nos genes nifQ e modA foram obtidos e apresentaram deficiência em fixação de nitrogênio sob condições limitantes de molibdênio. Estes mutantes foram também deficientes para crescimento dependente de nitrato, provavelmente devido a baixa atividade da molibdoenzima nitrato redutase.

xii

#### ABSTRACT

A  $\lambda$ EMBL3 genomic library of *H. seropedicae* was screened to isolate the genes downstream from *nifHDK* by plate hybridization with a 2 kb SalI fragment containing the nifDK genes of H. seropedicae as a probe. A recombinant phage,  $\lambda$ GK10, was isolated and sequenced and the 3'-region of the *nifK* gene and the 5'-region of the *nifE* genes were identified in a 1.2 kb Sall/EcoRI DNA fragment. The intergenic region did not reveal any sequence homologous to a nif promoter consensus sequence nor to any other known promoter. A lacZ fusion was inactive, confirming the absence of an active promotor in the nifK-nifE intergenic region. In a contiguous 4.0 kb EcoRI DNA fragment we found the 3'-region of the nifE gene and the nifNXorf1orf2 genes. No typical promoter was found in the sequenced region and complementation and *lacZ* fusion studies indicated that the *nifHDKENXorf1orf2* genes constituted a single operon regulated by  $O_2$  and  $NH_4^+$ . Insertional mutagenesis in *nifN*, *nifX* and orf1 showed that nifN is essential for nitrogen fixation in H. seropedicae but nifX, orf1 and orf2 were not. However, the nifX and orf1 genes were found to be essential for nitrogenase activity under conditions of iron limitation. In a 3.7 kb EcoRI-SalI DNA fragment located 3.0 kb downstream from this region we found the genes *nifQmodABCfixXC*. Insertional mutants in the *nifQ* and *modA* genes were obtained and were deficient in nitrogen fixation under low molybdenum conditions. These mutants were also deficient in nitratedependent growth, probably due to low activity of the molybdoenzyme nitrate reductase. In sumary, this work has identified and sequenced 13 open reading frames associates with nif genes in H. seropedicae and indicated, by site mutagenesis and physiological studies, the conditions in which these genes are essential for nitrogen fixation.

xiii

### 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio é o processo no qual o dinitrogênio é reduzido produzindo amônio. Esta reação é catalisada por um complexo enzimático existente somente em algumas espécies de procariotos chamados de diazotrofos (POSTGATE, 1982).

Os diazotrofos podem ser simbióticos, de vida livre ou associativos. Entre os diazotrofos simbióticos, destacam-se espécies da família Rhizobiaceae, que se associam à leguminosas, formando nódulos nas raízes, transferindo o amônio produzido para a planta (POSTGATE, 1982; PEDROSA, 1987).

Os microrganismos de vida livre, como *Rhodobacter capsulatus, Azotobacter spp, Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium pasteurianum,* não se associam às plantas (POSTGATE, 1982). Os microrganismos associativos, como *Azospirillum brasilense* encontra-se na rizosfera enquanto que, *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae,* encontram-se no interior de raízes, colmos e folhas de gramíneas como trigo, milho, sorgo e cana-de-açúcar (BALDANI *et al.,* 1986; DOBEREINER, 1992a, 1992b).

Os diazotrofos contribuem com aproximadamente 60% do nitrogênio fixado no planeta e são essenciais para a manutenção do ciclo do nitrogênio (BURNS e HARDY, 1975).

#### **1.2. O COMPLEXO NITROGENASE**

A nitrogenase é um complexo enzimático composto de duas metaloproteínas : a proteína ferro (proteína Fe) e a proteína molibdênio-ferro (proteína MoFe) (DEAN *et al.*, 1993).

A estequiometria da reação catalisada pelo complexo nitrogenase é a seguinte (SIMPSON e BURRIS, 1984):-

 $N_2 + 8 H^+ + 8e^- + 16 MgATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 MgADP + 16 Pi$ 

O hidrogênio é um inibidor competitivo do nitrogênio e produto obrigatório da redução do N<sub>2</sub> pela nitrogenase (MORTENSON e THORNELEY, 1979). A produção de hidrogênio pelo sistema pode ser mantida na presença de MgADP utilizando ditionito de sódio como redutor (YOUSAFZAI e EADY, 1999). Utilizando citrato de titânio como agente redutor, uma molécula de MgATP é hidrolisada para cada par de elétrons transferidos produzindo um menor gasto energético na reação (NYBORG *et al.*, 2000)

#### 1.2.1. Proteína Ferro

A proteína ferro é um homodímero  $\gamma_2$ , com massa molecular aproximada de 62 KDa (EADY, 1991). Cada subunidade possui um domínio com estrutura  $\alpha$  hélice/ folha  $\beta$  pregueada (GEORGIADIS *et al.*, 1992), e as subunidades estão unidas por um grupamento metálico [4Fe-4S]. Este núcleo [4Fe-4S] é simetricamente coordenado através de cisteínas nas posições 97 e 132 de cada subunidade (HOWARD *et al.*, 1989). A proteína Fe contém dois sítios para ligação de nucleotídeos, um em cada subunidade (GEORGIADIS *et al.*, 1992). A proteína Fe funciona como doadora de elétrons para a proteína MoFe (HAAKER *et al.*, 1984; GEORGIADIS *et al.*, 1992).

Estudos da sequência de aminoácidos, bem como da estrutura tridimensional revelaram homologia da proteína Fe com outras proteínas capazes de ligar nucleotídeos, incluindo a proteína *ras*, proteínas da superfamília de proteínas G e proteínas de transdução de energia da família da miosina (HAWKES *et al.*, 1984; HOOVER *et al.*, 1988).

#### 1.2.2. Proteína MoFe

A proteína MoFe é um tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  com massa molecular aproximada de 220 KDa, possuindo dois átomos de molibdênio, trinta e dois de ferro e trinta e dois de enxofre (EADY, 1991), arranjados em dois tipos de centros redox: o centro-P e o cofator ferro-molibdênio ou FeMoco (SMITH e EADY, 1992).

Cada tetrâmero possui dois centros-P que são núcleos metálicos do tipo [8Fe-7S] (PETERS *et al.*, 1997; SCHINDELIN *et al.*, 1997; MAYER *et al.*, 1999). Estes núcleos sofrem discreta mudança conformacional, envolvendo o movimento de dois átomos de ferro, quando ocorre a transferência de elétrons (MAYER *et al.*, 1999). Os centros-P sofrem mudanças redox durante os ciclos de redução da nitrogenase e provavelmente têm função de transferir elétrons, para o sítio de redução localizado no FeMoco (ANGOVE *et al.*, 1998; CHAN *et al.*, 1999).

O cofator FeMoco consiste de dois grupamentos metálicos cúbicos, [4Fe-3S] e [Mo-3Fe-3S], unidos por dois átomos de enxofre (SELMANN, 1993; CHAN *et al.*, 1993; MAYER, 1999). Este cofator possui também um componente orgânico, o homocitrato (SMITH e EADY, 1992). O homocitrato provavelmente tem a função de transferir os elétrons dos centros-P para o FeMoco (KIM e REES, 1994).

Os cofatores FeMoco encontram-se no interior das subunidades  $\alpha$ , enquanto que o par de centros-P encontra-se na interface entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Cada par  $\alpha\beta$  da proteína MoFe opera de modo independente como subunidade catalítica (KIM e REES, 1992). Há evidências da existência de múltiplos sítios para redução de diferentes substratos e também de sítios de ligação de inibidores, os quais podem operar de modo independente um do outro (SHEN *et al.*, 1997). Estas evidências foram confirmadas através da substituição de um resíduo His195- $\alpha$  por glutamina. Esta substituição afeta a estrutura eletrônica do cofator FeMoco e a ligação de N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, HN<sub>3</sub> e CN<sup>-</sup>; mas não altera a ligação de H<sup>+</sup>, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, HCN e CO (DILWORTH *et al.*, 1998).

O complexo da nitrogenase não possui alta especificidade pelo substrato, podendo reduzir uma série de compostos análogos ao nitrogênio com dupla ou tripla ligação, tais como acetileno, cianogênio, óxido nitroso e ciclopropeno (POSTGATE, 1982). A redução de todos os substratos necessita de MgATP (EADY, 1986). Destaca-se a importância da redução do acetileno a etileno, que tem sido o método de determinação da atividade da nitrogenase (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967).

#### 1.2.3. Mecanismos de proteção da nitrogenase contra o oxigênio

As proteínas Fe e MoFe, componentes do sistema enzimático nitrogenase, são rápida e irreversivelmente inativadas por exposição ao oxigênio (POSTGATE, 1982). Estudos espectroscópicos indicam que a exposição ao oxigênio resulta em uma sequência de mudanças nos estados de oxidação dos átomos de ferro da proteína Fe e MoFe (ROBSON e POSTGATE, 1980).

Os microrganismos aeróbios possuem mecanismos de proteção da nitrogenase contra o dano irreversível causado pelo oxigênio. *Azotobacter vinelandii* é uma bactéria fixadora de nitrogênio aeróbia obrigatória que possui oxidases ligadas à membrana. Estas oxidases consomem vigorosamente o oxigênio até uma concentração compatível com a fixação de nitrogênio (KELLY *et al.*, 1990). Quando este sistema não pode ser utilizado, como em condições limitantes de substrato, um outro mecanismo chamado de proteção conformacional é acionado. Esta proteção envolve uma proteína 2Fe-2S (proteína FeSII), que se liga ao complexo nitrogenase em altas tensões de oxigênio. Forma-se um complexo estável ao oxigênio mas que não fixa nitrogênio e, quando os níveis de oxigênio diminuem, a proteína FeSII se dissocia liberando a nitrogenase ativa (ROBSON *et al.*, 1979).

#### 1.2.4. Proteínas carreadoras de elétrons para a nitrogenase

Em *K. pneumoniae,* os elétrons utilizados para redução do nitrogênio são transportados em cadeia (ver esquema a seguir) a partir do piruvato na seguinte ordem: para a proteína NifJ (piruvato: flavodoxina oxidoredutase), para a proteína NifF, proteína Fe e finalmente para a proteína MoFe (DEISTUNG *et al.*, 1983).

elétrons → Piruvato → Piruvato-flavodoxina oxidoredutase → Flavodoxina → Proteína Fe → Proteína MoFe A proteína NifF é uma flavoproteína (ROBERTS *et al.*, 1978) que em reações de redução ou oxidação oscila entre as formas de quinona e hidroquinona (BOGUSZ *et al.*, 1981; DEISTUNG *et al.*, 1983).

O carreador de elétrons para a proteína Fe pode ser também ferredoxinas, que são proteínas que contém grupos FeS e são capazes de conduzir mudanças redox (POSTGATE, 1982).

#### 1.2.5. Redução do nitrogênio pelo complexo nitrogenase

A redução do nitrogênio pelo sistema nitrogenase envolve a transferência de elétrons da proteína Fe para a proteína MoFe (Figura 1).

A proteína Fe reduzida, ligada a duas moléculas de MgATP, associa-se à proteína MoFe, promovendo a transferência de um elétron para o centro-P. A seguir, o centro-P sofre mudanças redox e, atuando como intermediário, transfere o elétron para o FeMoco, que é o sítio responsável pela ligação e redução do substrato (N<sub>2</sub>) (SMITH, 1990; LANZILOTTA *et al.*, 1997; CHAN *et al.*, 1999).

O MgATP, ao ligar-se na proteína Fe, induz uma mudança conformacional da proteína provocando um deslocamento do grupamento [4Fe-4S] em direção à superfície do dímero. Após a interação com a proteína MoFe, a hidrólise de MgATP facilita a transferência de um elétron da proteína Fe para a proteína MoFe (GAVINI e BURGESS, 1992; DEAN *et al.*, 1993; PETERS *et al.*, 1997; JANG *et al.*, 2000).

A proteína Fe oxidada ligada a duas moléculas de MgADP dissocia-se da proteína MoFe (HAGEMAN e BURRIS, 1978; MENSINK e HAAKER, 1992, CHEN *et al.*, 1994).



Figura 1. Ciclo de oxidação-redução da nitrogenase. A proteína Fe reduzida e ligada a MgATP forma um complexo com a proteína MoFe, um elétron é transferido com simultânea hidrólise de MgATP. A etapa limitante da velocidade da reação é a dissociação da proteína Fe oxidada do complexo com a proteína MoFe. O ciclo é completado com formação de um novo complexo proteína Fe reduzida e MgATP. (GAVINI e BURGESS, 1992; DEAN et al., 1993; PETERS et al., 1997; JANG et al., 2000;CHAN et al., 2000) Estudos espectroscópicos indicam que MgATP se liga à proteína Fe, mas não interage diretamente com o núcleo [4Fe-4S] (MORGAN *et al.*, 1990). Evidências recentes sugerem que MgATP promove a transferência de elétrons entre as proteínas Fe e MoFe, acelerando a reação, enquanto que MgADP diminui, ou seja, a velocidade de transferência de elétrons é nucleotídeo dependente (CHAN *et al.*, 1999).

#### **1.3. NITROGENASES ALTERNATIVAS**

A existência de um sistema alternativo de fixação de nitrogênio da Mo nitrogenase foi demonstrado em mutantes contendo deleções de genes *nif* de *A. vinelandii* e *A. chroococcum* (BISHOP *et al.*, 1980; ROBSON *et al.*, 1986). Estes mutantes eram capazes de fixar nitrogênio na ausência de molibdênio. Uma nitrogenase contendo vanádio (ao invés de Mo) foi isolada destes organismos nos quais os genes para a nitrogenase convencional (contendo Mo) haviam sido deletados (ROBSON *et al.*, 1986). A síntese da V nitrogenase requer ausência de molibdênio e presença de vanádio e *A. vinelandii* é capaz também de fixar nitrogênio na ausência de Mo ou V, ou seja, é capaz de sintetizar um terceiro tipo de nitrogenase contendo ferro (PAU *et al.*, 1989).

A terceira nitrogenase contendo ferro foi também estudada em *Rhodobacter capsulatus* (SCHNEIDER *et al.,* 1991) e *Rhodospirillum rubrum* (DAVIS et al., 1991).

Existe ainda um quarto sistema da nitrogenase isolado de Streptomyces thermoautotrophicus que catalisa a redução do nitrogênio acoplada a oxidação do monóxido de carbono (CO) (RIBBE *et al.*, 1997). Uma desidrogenase transfere os elétrons derivados da oxidação do CO para o oxigênio, produzindo radicais superóxido. Uma enzima superóxido oxidoredutase reoxida os radicais superóxido transferindo os elétrons para uma proteína contendo MoFeS para redução do nitrogênio (RIBBE *et al.*, 1997).

## 1.4. GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Em *K. pneumoniae* foram identificados e sequenciados 20 genes *nif,* os quais se encontram agrupados numa região de aproximadamente 25 kb do genoma (Figura 2). Os genes *nif* encontrados em outros diazotrofos de vida livre tais como *A. vinelandii, A. chroococcum, R. capsulatus e Enterobacter agglomerans* têm sido comparados com *K. pneumoniae.* Estudos sugerem a existência de pelo menos 14 genes em comum entre esses organismos, que são os genes *nif H, D, K, E, N, X, U, S, V, Z, W, M, B, Q*, e cujos produtos devem ser essenciais para a biossíntese da nitrogenase (MERRICK, 1992).

O gene *nifH* codifica para as subunidades  $\gamma$  da proteína Fe e os genes *nifD* e *nifK* codificam as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína MoFe, respectivamente (ROBERTS *et al.*, 1978; SUNDARESAN e AUSUBEL 1981 IOANNIDIS e BUCK, 1987).

A proteína Fe além de transferir elétrons para a proteína MoFe tem outras duas funções distintas na fixação de nitrogênio. Participação na biossíntese do FeMoco (ROBINSON *et al.*, 1987) e envolvimento na maturação da apoproteína MoFe (ALLEN *et al.*, 1993). A presença do núcleo 4Fe-4S na proteína Fe não é essencial para sua função na síntese do FeMoco e maturação da apoproteína MoFe (DEAN *et al.*, 1993; RANGARAJ *et al.*, 1997). Os genes *nifEN* codificam para as proteínas NifE e NifN e formam um tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$ . Este tetrâmero está envolvido na síntese do FeMoco (PAUSTIAN *et al.*, 1989) provavelmente através da formação de um molde para construção do cofator. Isto porque os genes *nifN* e *nifE* apresentam alta similaridade com os genes *nifK* e *nifD*, respectivamente (ROBERTS *et al.*, 1978; BRIGLE *et al.*, 1987); NifN e NifE formam tetrâmeros  $\alpha_2\beta_2$  similar a proteína MoFe e porque o cofator FeMoco pode ser sintetizado na ausência da proteína MoFe, sugerindo que um outro tetrâmero está associado a ele (UGALDE *et al.*,1984).

O produto do gene *nifX* de *A. vinelandii* e *R. capsulatus* não é essencial para fixação de nitrogênio (JACOBSON, *et al.*, 1989a; MORENO-VIVIAN *et al.*, 1989a). Entretanto estudos recentes demonstraram que NifX de *A. vinelandii* é essencial para biossíntese do FeMoco "in vitro" (SHAH *et al.*, 1999). Além disso, NifX pode substituir VnfX (proteína com a mesma função de NifX no sistema de vanádio-nitrogenase) envolvido na biossíntese do cofator FeVaco da vanádio nitrogenase (RÜTTIMANN-JOHNSON *et al.*, 1999).

Estirpes de *A. vinelandii* e *K. pneumoniae* com deleções específicas nos genes *nifS* ou *nifU* acumulam proteína Fe inativa (JACOBSON *et al.*, 1989b; ROBERTS *et al.*, 1978). O produto do gene *nifS* é um homodímero contendo piridoxal fosfato, que catalisa a desulfurização específica da cisteína, produzindo alanina e enxofre inorgânico (ZHENG *et al.*, 1993). O produto do gene *nifU* é um homodímero que aparentemente está envolvido na formação de núcleos metálicos contendo 2Fe-2S, que seriam doados para formas imaturas da proteína Fe e MoFe. NifU poderia ainda interagir com NifS para liberar enxofre para a formação de núcleo Fe-S da proteína Fe (DEAN *et al.*, 1993; FU *et al.*, 1994). Estudos espectroscópicos revelaram a presença de um grupo 2Fe2S e embora a função de NifU não seja conhecida tem sido proposto que o produto do gene *nifU* esteja envolvido na captação do ferro para formação do grupo FeS de componentes da nitrogenase (ZHENG *et al.*, 1998).

JACOBSON *et al.* (1989b) estudaram estirpes de *A. vinelandii* com mutações nos genes *nifWZ* e observaram que os produtos destes genes são necessários para a estabilidade e processamento da proteína MoFe. Em *K. pneumoniae* os genes *nifW* ou *nifZ* não são essenciais para fixação de nitrogênio, embora a desrepressão da atividade da nitrogenase seja mais lenta nesses mutantes, sugerindo que as funções dos produtos destes genes poderiam ser realizadas parcialmente por outras proteínas (PAUL e MERRICK, 1989). Estudos recentes revelaram que NifW forma um complexo multimérico e, este complexo, associando-se com NifZ, é capaz de interagir com a nitrogenase em *A. vinelandii* (LEE *et al.*, 1998).

Mutantes *nifM<sup>-</sup>* de *A. vinelandii* apresentam proteína Fe e MoFe com baixa atividade (HOWARD *et al.*, 1986). A proteína NifM parece estar envolvida na ativação da proteína Fe. Em mutantes NifM<sup>-</sup> de *K. pneumoniae* foi determinada a ocorrência de um defeito na biossíntese e inserção do grupo 4Fe4S da proteína Ferro (HOWARD *et al.*, 1989). Recentemente, em *A. vinelandii*, foi demonstrado que a proteína NifM é essencial para atividade das três nitrogenases, e que as proteínas ativadoras de transcrição das nitrogenases alternativas (VnfA e AnfA) podem regular a expressão do gene *nifM* (LEI *et al.*, 1999).

Mutantes *nifV* de *A. vinelandii* apresentam redução do crescimento diazotrófico, baixa atividade da proteína MoFe e atividade normal da proteína Ferro (JACOBSON *et al.*, 1989b). A proteína NifV é um homodímero que catalisa a condensação do acetil-CoA e do  $\alpha$ -cetoglutarato para formar o homocitrato que é o componente orgânico do FeMoco (HOOVER *et al.*, 1989; ZHENG *et al.*, 1997).

O produto do gene *nifB*, denominado de NifB-co, é um precursor do cofator FeMoco que contém ferro e enxofre (SHAH *et al.*, 1994; ROOL *et al.*, 1995).

O gene *nifQ* é importante para incorporação de molibdênio na proteína MoFe em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* (IMPERIAL *et al.*, 1984; JOERGER e BISHOP, 1988). Mutantes neste gene necessitam de altas concentrações de molibdênio para crescerem diazotroficamente.

Em *K. pneumoniae* além dos genes *nif* essenciais para biosíntese do complexo da nitrogenase existem outros genes relacionados com a fixação de nitrogênio. Entre estes o produto do gene *nifJ*, a piruvato flavodoxina oxidoredutase, atua em conjunto com o produto do gene *nifF*, uma flavodoxina, na transferência de elétrons do piruvato para a proteína Fe (BOGUSZ *et al.*, 1981; HILL e KAVANAGH, 1980; DEISTUNG *et al.*, 1983). Em *R. capsulatus*, NifF é essencial para a fixação de nitrogênio em condições limitantes de ferro (GENNARO, *et al.*, 1996) e atua em paralelo com FdI (ferredoxina I), conduzindo elétrons para a proteína Fe (HALLENBECK e GENNARO, 1998).

O gene *nifT* de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii,* é co-transcrito com os genes *nifHDK*, o que sugeriu que o produto deste gene poderia estar envolvido na maturação da nitrogenase. Entretanto, mutantes *nifT* crescem diazotroficamente de forma semelhante à estirpe selvagem (JACOBSON *et al.*, 1989b; SIMON *et al.*, 1996).

o produto do gene *nifY* de *K. pneumoniae* se associa a apoproteína MoFe (apoMoFe) e está envolvida na maturação do FeMoco (HOMER *et al.*, 1993). Em *A. vinelandii* a maturação do FeMoco na apoMoFe é auxiliada pela proteína  $\gamma$ , cuja função é mobilizar a apoMoFe em uma conformação que permita o acesso do FeMoco ao seu sítio de ligação. A proteína  $\gamma$  não é uma proteína *nif* e funciona como uma chaperona insertase

Introdução 13

durante a biossíntese da proteína MoFe. Em *A. vinelandii* o gene que codifica para a proteína  $\gamma$  não é conhecido embora se saiba que não se trata do produto do gene *nifY* de *K. pneumoniae* (HOMER *et al.*, 1995).

Os genes que codificam para as V e Fe nitrogenases são chamados vnf e anf, respectivamente, e há significante similaridade entre os genes para as proteínas estruturais entre os complexos nitrogenase (BISHOP, e JOERGER, 1990). Todos os sistemas contém dois componentes, а dinitrogenase (chamada de proteína MoFe no sistema contendo Mo) e dinitrogenase redutase (também chamada de proteína Fe). Os genes nif codificam as proteínas da dinitrogenase formando um tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  produtos dos genes nifDK, enquanto que as dinitrogenase alternativas contém uma terceira subunidade  $\delta$  formando um hexâmero  $\alpha_2 \beta_2 \delta_2$  e são codificados pelos aenes *vnfDKG* ou anfDKG respectivamente (ROBSON et al., 1989). As proteínas codificadas pelo genes vnf contém um cofator que contém V e que é capaz de reconstituir a apodinitrogenase contendo Mo de mutantes no gene nifB (SMITH et al., 1988). Portanto os cofatores dos sistemas nif e vnf são muito similares, e evidências genéticas de que vários produtos envolvidos com a síntese do FeMoco são necessários para síntese, maturação e funcionamento das dinitrogenases alternativas (JOERGER e BISHOP, 1988; KENNEDY e DEAN, 1992; RODRIGUEZ-QUIÑONES, 1993).

A proteína Fe dos sistemas alternativos é muito similar aquela codificada pelos genes *nif* contendo também um grupamento [4Fe-4S] (EADY, *et al.*, 1988; SCHENEIDER, *et al.*, 1991).

Os genes *fix* estão envolvidos com a fixação de nitrogênio em organismos simbióticos, não possuindo homólogos com os genes *nif* de *K. pneumoniae* (GLUBER e HENECKE 1986). Os genes *fixABC* foram identificados em diferentes espécies de *Rhizobium*, em associativos como *Azospirillum brasilense* (FOGHER *et al.*, 1985; GALIMAND *et al.*, 1989) e de vida livre



Figura 2. Organização estrutural e função dos genes nif em K. pneumoniae. (MERRICK et al., 1992).

como *Azotobacter* (GLUBER e HENECKE, 1986; EARL *et al.*, 1987; EVANS *et al.*, 1988). Mutantes na região *fixABCX* em *R. meliloti* (PUHLER *et al.*, 1984; DUSHA *et al.*, 1987), *B. japonicum* (GUBLER e HENNECKE, 1986) e *A. caulinodans* (KAMINSKI et al., 1988) não fixam nitrogênio e não formam nódulos. O gene *fixX* codifica para uma ferredoxina e tem sido proposto que FixA, B, C e X estão envolvidos com o transporte de elétrons para a nitrogenase (EARL *et al.*, 1987; DUSHA, *et al.*, 1987).

## 1.5. BIOSSÍNTESE E INSERÇÃO DO FeMoco

A biossíntese do cofator FeMoco em *A. vinelandii* inicia-se no tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  formado pelas proteínas NifEN. O tetrâmero NifEN contém dois núcleos [4Fe-4S] idênticos que podem ter função na formação e estabilização do complexo tetramérico (PAUSTIAN *et al.*, 1989; GOODWIN, *et al.*, 1998). O complexo NifEN associa-se com NifB-co que contém uma forma precursora do cofator FeMoco composto de átomos de ferro e enxofre (PAUSTIAN *et al.*, 1989; ROOL *et al.*, 1995; ALLEN *et al.*, 1995). As proteínas NifU e NifS estão envolvidas na mobilização de Fe e S (FU *et al.*, 1994; ZHENG *et al.*, 1993; ZHENG *et al.*, 1998) e tem sido proposto seus envolvimentos na biossíntese do NifB-co (RANGARAJ *et al.*, 2000).

Quando todos os componentes para biossíntese do FeMoco estão presentes, sejam eles, NifEN, NifB-co, MgATP, homocitrato, proteína Fe e proteína  $\gamma$  ocorre a incorporação de molibdênio no FeMoco que é então transferido para a apoproteínaMoFe (ALLEN *et al.*, 1995; ALLEN *et al.*, 1999). Ainda não se conhece exatamente em qual etapa o molibdênio é incorporado no cofator, mas há evidências de que a proteína  $\gamma$  esteja diretamente envolvida nesse processo. O molibdênio se acumula em diversas proteínas ainda não identificadas, as quais podem ser componentes adicionais para síntese do cofator (ALLEN *et al.*, 1999).

Tem sido propostos dois mecanismos envolvendo a proteína  $\gamma$  na inserção do FeMoco maduro na apoproteína MoFe em *A. vinelandii*. No primeiro mecanismo a proteína  $\gamma$  se liga ao FeMoco maduro e o insere na apoproteína, no segundo modelo a proteína  $\gamma$  se liga primeiro na apoproteína e então insere o FeMoco (HOMER *et al.*, 1995).

A produção de formas alteradas de proteína Fe revelaram que esta proteína contém domínios que atuam independentemente na síntese e maturação do FeMoco embora o mecanismo exato dessas interações ainda não tenha sido esclarecido. (GAVINI e BURGUESS, 1992; WOLLE *et al.*, 1992; RANGARAJ *et al.*, 1999a). Existem evidências de interação da proteína Fe com o complexo NifEN-NifB-co induzindo mudanças conformacionais, comprovando portanto a formação de um complexo entre estas proteínas. Numa etapa posterior a formação deste complexo poderia envolver também a proteína NifX (RANGARAJ *et al.*, 1999b). Não se sabe exatamente qual o papel proteína NifX na biossíntese do cofator embora existam evidências de seu envolvimento na transferência do cofator do complexo NifEN para a apoproteínaMoFe (SHAH, *et al.*, 1999).

A biossíntese do cofator da nitrogenase alternativa contendo V é muito similar, e as proteínas NifUS, NifB e NifV são comuns aos dois sistemas. Na biossíntese do FeVaco as proteínas VnfEN, VnfH, VnfX, VnfD, VnfK e VnfG são específicas do sistema alternativo contendo vanádio (BISHOP e PREMAKUMAR, 1992).



Figura 3. Biossíntese e inserção do FeMoco na apoproteína MoFe. As proteínas NifU e NifS mobilizam Fe e S para a proteína NifB originando NifB-co, que forma um complexo com as proteínas NifEN. Ao complexo NifEN-NifB-co é adicionado Mo e homocitrato na presença da proteína Fe, da proteína γ, NifX e MgATP. A última etapa é a inserção do FeMoco maduro na apoproteínaMoFe na presença proteína Fe, da proteína γ e MgATP. (GAVINI e BURGUESS, 1992; ROOL *et al.*, 1995; ALLEN *et al.*, 1995/1999;RANGARAJ *et al.*, 1999a/b; SHAH *et al.*, 1999).

#### 1.6. GENES mod

O molibdênio é um elemento essencial não somente para o cofator da dinitrogenase, mas também para outras molibdoenzimas, incluindo a nitrato redutase e a dimetilsulfóxido redutase (WOOTTON *et al.*, 1991).

O molibdênio é captado e internalizado em bactérias por um sistema de transporte composto das proteínas, ModA, ModB e ModC (AMES, 1986; SILVER e WALDERHAUG, 1992). Estas proteínas são codificadas pelos genes *modA*, *modB* e *modC*, respectivamente.

As sequências de aminoácidos das proteínas ModA, ModB e ModC de diferentes organismos (E. coli, Haemophillus influenzae, A. vinelandii e R. capsulatus) são conservadas. Em E. coli a proteína ModA forma um complexo com molibdato que migra em gel de poliacrilamida não desnaturante mais rapidamente do que a proteína livre. Isto sugere uma mudança conformacional da proteína ModA, quando em ligação com o molibdato (QUIOCHO e LEDVINA, 1996). A proteína ModB contém seis regiões hidrofóbicas, sugerindo que é uma proteína transmembrana. A natureza hidrofóbica desta proteína, sua similaridade com membros da família de transportadores ABC e sua localização a jusante ao gene modA sugere que a proteína ModB seja a proteína formadora do canal por onde o molibdato atravessa a membrana (LINTON et al., 1998). A proteína ModC tem um ligação de ATP, sugerindo que sua função é a de motivo típico para acoplamento a hidrólise deste nucleotídeo, com o transporte de molibdato (LINTON et al., 1998). No mesmo operon modABC, em E. coli, há uma ORF, designada modD. Nenhuma proteína homóloga foi encontrada em outro organismo e a deleção de modD de E. coli não produziu nenhuma alteração fenotípica (MAUPIN-FURLOW et al., 1995).

Mutações em quaisquer dos três genes *modA*, *modB* ou *modC*, em *E. coli*, leva a defeitos pleiotrópicos na atividade das molibdoenzimas. Estes efeitos podem ser suprimidos pela adição de excesso de íons molibdato no meio de crescimento (MAUPIN-FURLOW *et al.*, 1995). Em *E. coli* a expressão dos genes *mod* é reprimida pelo produto do gene *modE*, dependendo da disponibilidade de molibdato (GRUNDEN *et al.*, 1996). A organização de operons *mod* em diversos organismos está mostrada na Figura 4.

Em *E. coli* e *K. pneumoniae* o transporte e incorporação de Mo em molibdoenzimas é regulado (PIENKOS e BRILL, 1981; CORCUERA, *et al.*, 1993). Nenhum microrganismo parece acumular molibdato, a não ser *A. vinelandii* que tem uma proteína específica para isso (PIENKOS e BRILL, 1981).

O sistema de transporte de molibdato em *A. vinelandii* é muito similar ao de *E. coli*. Os genes *modEABC* compõe um operon (LUQUE *et al.*, 1993; MOUNCEY *et al.*, 1995). A proteína ModE é similar a de *E. coli* e é sintetizada constitutivamente, enquanto a biossíntese da proteína ModA é reprimida por ModE em altos níveis de molibdato. O gene *modG* de *A. vinelandii* codifica para uma proteína com similaridade com a proteína ModE e também com as proteínas Mop (MOUNCEY *et al.*, 1996).

O operon *mod* em *R. capsulatus* é similar ao de *A. vinelandii* e *E. coli* em sua organização, mas contém genes adicionais (WANG *et al.*, 1993). Os três genes que compõe o sistema de alta afinidade para o molibdato e um homólogo ao gene *modE* (denominado *mopA*) fazem parte de um operon. Neste organismo foi identificado também o gene *modD* que não é homólogo ao *modD* de *E. coli* (WANG *et al.*, 1993). O papel desta proteína é desconhecido. Transcrito em direção oposta ao operon *mopAmodABC* está o gene *mopB*, cuja proteína é similar à MopA. Somente o duplo mutante *mopAB* desreprime a expressão de *modA* em presença de molibdato (KUTSCHE *et al.*, 1996; MASEPHOL e KLIPP, 1996).

As proteínas MopA e MopB possivelmente formam um heterodímero e interagem com a região promotora do operon *mopAmodABC* (KUTSCHE, 1996). Os genes *mod* estão localizados próximos ao agrupamento *nif* em *R. capsulatus* e, além disso, requerem a proteína NtrC para sua expressão (KUTSCHE *et al.*, 1996).

Em *C. pasteurianum* o transporte e acúmulo de molibdato é máximo somente em células crescidas em meio com condições limitantes de molibdato, amônio e sulfato (ELLIOTT e MORTENSON, 1975). Em *B. japonicum* também foi demonstrada a existência de um sistema de alta afinidade para o molibdato (MAIER *et al.*, 1987; MAIER e GRAHAM, 1988).

Em *H. influenzae* foram identificados dois operons cujos produtos são similares a ModABC e ModE de *E. coli* (FLEISCHAMNN *et al.*, 1995).



Figura 4. Organização de operons mod em diversos organismos. As setas indicam a direção de transcrição.

## 1.7. REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

#### 1.7.1. Regulação da transcrição dos genes nif em K. pneumoniae

Todos os operons *nif* exceto o operon *nifLA* são controlados pelos produtos dos genes *nifL* e *nifA*. NifA é o regulador positivo (DRUMMOND *et al.*, 1983; OW E AUSUBEL, 1983), enquanto que NifL controla a atividade de NifA em resposta a amônia e ao oxigênio (MERRICK *et al.*, 1982; SANTERO *et al.*, 1989). A transcrição dos gene *nif* é dependente também do produto do gene *rpoN*, o fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase (HUNT e MAGASANIK, 1985).

A proteína NifA se liga a uma sequência ativadora UAS (*upstream activating sequences*) TGT-N<sub>10</sub>-ACA localizada aproximadamente 100 pares de bases a montante do início de transcrição (DRUMMOND *et al.*, 1983; BUCK *et al.*, 1986). A proteína NifA é um ativador de transcrição que funciona com a RNA polimerase que contém  $\sigma^{54}$  como subunidade sigma. A holoenzima  $\sigma^{54}$  reconhece a sequência promotora TGGCAC-N<sub>4</sub>-TTTGC que possui os nucleotídeos GG e GC, invariavelmente conservadas nas posições – 25/-24 e –13/-12, respectivamente (HUNT e MAGASANIK, 1985). Portanto, a proteína NifA catalisa a isomerização do complexo fechado entre  $\sigma^{54}$ -RNA polimerase e os promotores *nif* formando o complexo aberto em uma reação que requer a hidrólise de ATP ou GTP pela proteína NifA (BUCK et al., 1986; LEE *et al.*, 1993).

A ativação do operon *nifLA* é dependente do fator  $\sigma^{54}$  e da proteína NtrC (MERRICK, 1983; WONG *et al.*, 1987). Em baixos níveis de amônia a proteína NtrB fosforila NtrC, que é a forma capaz de ativar a transcrição do operon *nifLA* (MERRICK, 1983; KEENER e KUSTU, 1988). A proteína NtrC reconhece uma sequência consenso GCAC-N<sub>5</sub>TGGTGCA (REITZER e MAGASANIK, 1985).
### **1.8.** Herbaspirillum seropedicae

Herbaspirillum seropedicae é um diazotrofo que foi isolado da rizosfera ou da superfície de raízes de milho, sorgo e arroz (BALDANI *et al.*, 1986), e tem sido também isolado de cana-de-açúcar (PIMENTEL *et al.* 1991; BALDANI *et al.* 1992). Esta bactéria pertencente à subdivisão  $\beta$  das proteobactérias (YOUNG, 1992) é gram negativa, vibrióide, com diâmetro de 0,6 a 0,7 µm e tamanho variando de 1,5 a 5 µm conforme o meio de cultivo utilizado. São microrganismos aeróbios, móveis, que fixam nitrogênio em condições de microaerofilia (BALDANI *et al.*, 1986).

*H. seropedicae* foi inicialmente descrito como uma nova espécie do gênero *Azospirillum* (BALDANI, 1984). Entretanto, estudos de hibridização rRNA/DNA revelaram apenas 9 a 22 % de homologia com as espécies de *Azospirillum* (*A. lipoferum, A brasilense, A. amazonense*) (FALK *et al.*, 1986).

Atualmente sabe-se que *H. seropedicae* é um microrganismo endofítico. Ao contrário do observado com *A. brasilense*, este microrganismo não sobrevive em solos isentos de raízes (BALDANI *et al.*, 1992). Este tipo de associação diazotrofo-planta tem mudado os conceitos clássicos e talvez explique os altos níveis de fixação de nitrogênio obtidos com diferentes gramíneas (DOBEREINER, 1992a/b; 1993).

A importância atribuída ao gênero *Herbaspirillum* provém da sua capacidade de fixação de nitrogênio em associação com gramíneas de interesse econômico (DOBEREINER, 1992a). PEREIRA *et al.* (1989) observaram que a inoculação de *H. seropedicae* leva à um aumento da germinação das sementes.

Com a expectativa de melhor aproveitamento deste microrganismo na agricultura, estudos genéticos e fisiológicos vem sendo realizados.

Estudos de fisiologia em *H. seropedicae* revelaram que nitrogenase neste organismo pode ser rapidamente inibida pela adição de amônio e outras fontes de nitrogênio (glutamato, glutamina, alanina, serina) na cultura. Este efeito ocorre provavelmente pela alteração do suprimento de elétrons para a nitrogenase causado pelo transporte desses compostos (KLASSEN *et al.*, 1997).

Além dos estudos fisiológicos, a análise genética de genes estruturais e reguladores da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* vem sendo realizada.

PEDROSA *et al.* (1989) obtiveram os primeiros resultados com o isolamento e sequenciamento dos genes *nifAB* (SOUZA, 1990). Na região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foram identificados um sítio de ligação para NifA e uma sequência consenso para promotor do tipo -24/-12(SOUZA *et al.*, 1991). O gene *nifB* é expresso somente na ausência de amônio, em baixas tensões de oxigênio, é dependente do fator  $\sigma^{54}$  e da proteína NifA (REGO *et al.*, 1997).

Na região promotora do gene *nifA* foram encontradas sequências homólogas ao promotor tipo -24/-12, juntamente com os sítios de ligação para as proteínas NifA e NtrC (SOUZA *et al.*, 1991). A transcrição do gene *nifA* é dependente das proteínas NtrC e  $\sigma^{54}$ , e a proteína NifA é essencial para transcrição máxima do gene *nifA* em condições de fixação de nitrogênio (WASSEN *et al.*, 1999).

Em *H. seropedicae* a proteína NifA é inibida por oxigênio, provavelmente devido a presença de um domínio contendo cisteínas e por amônia através do domínio N-terminal (SOUZA *et al.*, 1999).

O gene *glnB* que codifica para a proteína  $P_{II}$  foi isolado e sequenciado (BENELLI et al., 1997). Mutante neste gene é incapaz de fixar

nitrogênio e a proteína P<sub>II</sub> parece estar envolvida no controle da atividade da proteína NifA em *H. seropedicae*.

Os genes *glnAntrBC* foram isolados (TEIXEIRA, 1991), sequenciados e mutantes *ntrB* e *ntrC* foram obtidos (PERSUHN *et al.*, submetido) e revelaram que estes genes são essenciais para fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*.

Os genes *nifHD* e parte do gene *nifK* de *H. seropedicae* foram também isolados e sequenciados (MACHADO *et al.*, 1996). Análises de fusões *lacZ* demonstraram a presença de um promotor  $\sigma^{54}$ , bem como um sítio de ligação para proteína NifA a montante do gene *nifH*. Nenhuma sequência promotora foi encontrada nas regiões intergênicas *nifHD* e *nifDK* (MACHADO *et al.*, 1999).

### **1.9. OBJETIVOS**

A maioria dos genes essenciais para a fixação de nitrogênio em *K. pneumoniae* ainda não foram identificados em *Herbaspirillum seropedicae*.

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo de genes envolvidos na fixação de nitrogênio de *H. seropedicae* e os objetivos específicos foram:

1. Isolar genes *nif* localizados a jusante dos genes *nifHDK* (MACHADO *et al.*, 1996) em *H. seropedicae.* 

 Sequenciar os genes isolados, identificando regiões codificadoras de proteínas, sequências promotoras e determinar a similaridade dos genes isolados com genes de outros microrganismos fixadores de nitrogênio.

3. Determinar a organização estrutural dos genes isolados.

4. Obter mutantes nos genes isolados e caracterizá-los fisiologicamente.

# 2. MATERIAL E MÉTODOS

# 2.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizados estão descritos

na Tabela 1.

# Tabela 1. Bactérias e Plasmídeos

Bactéria	Estirpe	Fenótipo/Genótipo	Referência
Herbaspirillum	SMR1	Nif <sup>+</sup> , Sm <sup>R</sup>	Pedrosa et
seropedicae	(selvagem)		<i>al.,</i> 1997
	GK52	SMR1 <i>nifN</i> ::Tn <i>5</i> -B20 , Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabalho
	GK10	SMR1 <i>nifX</i> ::Km , Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ,	Este trabalho
	GK11	SMR1 <i>nifX</i> ::Km , Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ,	Este trabalho
	GK22	SMR1 orf1:: lacZKm, Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabalho
	GK55	SMR1 <i>nifO</i> :: <i>lacZ</i> Km, Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabalho
	GK60	SMR1 modA::Km, Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabalho
Escherichia	71-18	∆( <i>lac</i> pro) F'[ <i>lacIq lacZ</i> ∆M15	Sambrook et
coli		proAB]supE	<i>al</i> ., 1989
	S17-1	thi pro <i>hsdR rec</i> A Spc <sup>R</sup>	Simon et al., 1983
	LE392	hsdR514 (rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> ) supE44 supF58	Stratagene
	YMC10	galk2 galT22 metb1 trpr55 pro, thi, endA, hsdR, $Pro^+$ , $\Delta lacU169$ , hutCC	Backman <i>et</i> <i>al.,</i> 1981
Vetor			
pTZ18/19R		Ap <sup>R</sup>	Pharmacia
pUC4K		Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Pharmacia
рКОК6.1		Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , contém <i>lacZ</i> -Km	Kokotek e
		sem promotor	Lotz 1989.
pLAFR3.18		Tc <sup>R</sup> , Mob <sup>+</sup>	Machado et
			<i>al</i> ., 1995
pSUP202		Tc <sup>R</sup> , Cb <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Mob <sup>+</sup>	Simon <i>et al.</i> ,
DW/452		Tc <sup>R</sup> contém /acZ sem promotor	D Woodley
pMP220		$Tc^{R}$ , contém <i>lacZ</i> sem promotor	Spaink <i>et al.,</i> 1987

Plasmídeo	Vetor	Propriedades Relevantes	Referência
pTGK4.0	pTZ19R	Fragmento EcoRI de 4,0 kb de H.	Este trabalho
		seropedicae SMR1 contendo nifE	
		(parcial) <i>nifNXorf1orf</i> 2	
pSGK4.0	pSUP202	Fragmento <i>Eco</i> RI de 4,0 kb de $H$ .	Este trabalho
		seropedicae SMR1 contendo nifE	
		(parcial) nifNXorf1orf2	
pSGK4.0.23	pSUP202	Tn5-B20 transposon inserido em	Este trabalho
	- 6110202	nifN	
pSGK4.0.1	pSUP202		
		no sitio Saci de nirx na mesma	Este trabalho
-CCK4 0 2	20201	orientação de transcrição	Ecto trabalho
p5GK4.0.2	p50P202	Cassele de Kin de pocak insendo	Este trabalho
		no sitio Saci de mila em onentação	
nTCK1 2	pT710P	Eragmonto Sall-EcoPI do 1.2 kh do	Ecto trabalho
pigki.z	PIZISK	H seronedicze SMP1 contondo	
		nifk (região-5') nifE (região-3')	
nPCK1 2	nP\\/452	Fragmento Sall-EcoPI de 1 2 kh de	Este trabalho
pron1.2	pi w+52	H seronedicae SMR1 contendo	
		nifK (região 3') nifF (região 5')	
nTGK1 3	nT719R	Fragmento SacI-EcoRI de 1.3 kb	Este trabalho
proteins	prezon	de H. seronedicae contendo nifX	
		(região 3') orf1orf2.	
pTGK1.3.1	pTZ19R	Cassete <i>lacZ</i> -Km do pKOK6.1	Este trabalho
P · • · · · · · · · · ·	<b>P</b> · <b>-</b> - <b>P</b> · ·	inserido no sítio NsiI da orf1 na	
		mesma orientação de transcrição.	
pLGK4.0	pLAFR3.18	Fragmento EcoRI de 4,0 kb de H.	Este trabalho
•	•	seropedicae SMR1 contendo nifE	
		(região 3') nifNXorf1orf2.	
pTGK3.7	pTZ18R	Fragmento EcoRI-SalI de 3,7 kb de	Este trabalho
		H. seropedicae SMR1 contendo	
		nifQ (região 3') modABCfixXC.	
pTGK3.7.1	pTZ18R	Cassete <i>lacZ</i> -Km do pKOK6.1	Este trabalho
		inserido no sítio <i>Bam</i> HI de <i>nifQ</i> ,	
		em direção contrária da	
	_	transcrição.	
pTGK3.7.2	pTZ18R	Cassete de Km de pUC4K inserido	Este trabalho
		no sitio SacI de modA na mesma	
		orientação de transcrição.	
pMGK1.0	рмр220	Fragmento de 1,0 kb contendo a	Este trabalho
	-77100	regiao intergenica <i>nirQ-modA</i> .	Ecto trabalho
pigk3.4	pizi9k	de U serenedicae	Este traballio
-MC71A	-ACVC194		Buchanan-
pMC/1A	pacicio4	mia de K. pheumomae.	Wollaston et
			al., 1981
nIMA217	nMP220	Fragmento de 1.7 kb contendo o	Machado et
hti.ucet.	PI 11 220	gene nifH e a região 5' do gene	al., 1996.
		nifD de H. seropedicae.	,
		,	

### 2.2. REAGENTES

Antibióticos, enzimas e reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Company, Merck Company, Gibco-BRL, Pharmacia Biotech e British Drug House (BDH). O nucleotídeo marcado [ $\alpha$  <sup>32</sup>P] dCTP foi obtido da Amersham International. Os gases nitrogênio, hidrogênio, acetileno, ar comprimido e etileno padrão (100 ppm) foram adquiridos de White Martins S.A.

## 2.3. MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP (MACHADO *et al.*, 1995), cuja composição é a seguinte:

	gramas/iitro
MgSO₄.7H₂O	2 x 10 <sup>-1</sup>
NaCl	1 x 10 <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	2 x 10 <sup>-2</sup>
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 <sup>-2</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-2</sup>
Malato de sódio	5 x 10 <sup>-1</sup>
Biotina	1 × 10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,35 x 10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 x 10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	8 x 10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,4 x 10 <sup>-4</sup>

Os meios NFbHP sólido e semi-sólido foram preparados pela adição ao meio líquido de 15 e 1,75 g/L de ágar, respectivamente.

O meio NFbHP isento de molibdênio foi preparado utilizando-se os sais diluídos em água tratada com carvão ativo como descrito (SCHNEIDER *et al.,* 1991).

Solução de fosfatos:	gramas/litro		
KH₂PO₄	159,7		
K₂HPO₄	17,8		

A solução de fosfatos foi autoclavada separadamente e adicionada 50 ml/L no momento de uso.

Foram utilizadas como fontes de nitrogênio cloreto de amônio 2 mmol/L (NFbHPN2) para experimentos de desrepressão da nitrogenase (KLASSEN *et al.*, 1997) ou 20 mmol/L (NFbHPN20) para crescimento de préinóculo. Em meio semi-sólido não foi acrescentado nitrogênio fixado.

Os meios de cultura utilizados para o cultivo das estirpes de *E. coli* foram Luria-Broth (LB), Terrific Broth (TB), (SAMBROOK *et al.*, 1989) ou NFDM (DIXON *et al.*, 1977).

O meio LB possui a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH foi corrigido para 7,0 com NaOH 1mol/L. O meio sólido (LA) foi preparado pela adição de 15g/L de agar ao meio líquido.

O meio TB possui a seguinte composição:

	gramas/litro
Bacto triptona	12,0
Extrato de levedura	24,0
Glicerol	4,0

Solução de fosfatos:					
KH₂PO₄	23,2				
K₂HPO₄	125,4				

A solução de fosfatos foi autoclavada separadamente e adicionada no momento do uso.

O meio NFDM possui a seguinte composição:

	gramas/litro
K₂HPO₄	12,04
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4
MgSO₄	0,1
NaMoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0025
Glucose	20g

Os fosfatos e a glucose foram preparados em separado e adicionados ao meio somente no momento de uso. Este meio foi suplementado com cloreto de amônio (20 mmol/L), nitrato de potássio (10 mmol/L) ou glutamina (10 µg/mL), como fontes de nitrogênio.

# Solução para bacteriófagos SM (SAMBROOK, *et al.*, 1989) : gramas/litro

NaCl	5,8
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,0
Tris.HCl 1 M pH 7,5	50 mL
Gelatina 2% (m/v)	5 mL

## 2.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados foram: tetraciclina 10  $\mu$ g/mL, cloranfenicol 30  $\mu$ g/mL, ácido nalidíxico 10  $\mu$ g/mL, ampicilina 250  $\mu$ g/mL, canamicina 50  $\mu$ g/mL para *E. coli* e 500  $\mu$ g/mL para *H. seropedicae e* estreptomicina 50  $\mu$ g/mL. As soluções de tetraciclina e cloranfenicol foram preparadas em 50% e 95% de etanol, respectivamente. As soluções estoque de estreptomicina, canamicina e ampicilina foram preparadas em água destilada e esterilizadas em filtro milipore de 0,2  $\mu$ m. A solução de ácido nalidíxico foi preparada em água destilada, neutralizada com NaOH 1mol/L e esterilizada por filtração. Todas as soluções estoques de antibióticos foram mantidas a 0°C.

# 2.5. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFbHPN20 a 30°C, sob agitação a 130 rpm durante 16 horas. As estirpes de *E. coli* foram crescidas em meio LB, TB ou NFDM a 37°C, também sob agitação a 130 rpm. As estirpes de *E. coli* e de *H. seropedicae* foram estocadas em glicerol 50%.

### 2.6. ATIVIDADE DA NITROGENASE

### 2.6.1. Atividade da nitrogenase em meio líquido

H. seropedicae foi cultivado em 100 ml de meio NFbHPN2, em frascos de 250 ml a 30°C e agitação de 120 rpm. Após 18 horas, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, ressuspensas em meio NFbHP (sem fonte de nitrogênio) em alíquotas de 20 ml (D.O.<sub>550</sub> =1,0) em frascos de 60 ml e incubadas por 4 horas sob agitação. Nestas condições, as fontes de nitrogênio são exauridas e a tensão de oxigênio torna-se ideal para desrepressão da nitrogenase (KLASSEN et al., 1997). Para determinar a atividade da nitrogenase, os frascos com as culturas foram fechados com rolha de borracha e acetileno injetado (10% da fase gasosa). As culturas contendo acetileno foram incubadas por uma hora a 30°C, sob agitação. Alíquotas de 0,5 mL da fase gasosa foram coletadas e utilizadas para determinar através de cromatografia gasosa a quantidade de etileno produzido (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967). O cromatógrafo utilizado foi o Varian, modelo 3400, equipado com coluna Porapak N e detector de ionização de chama. O gás de arraste foi o nitrogênio super-seco (fluxo de 20mL/min). A temperatura da coluna foi de 110°C, a do detector 140°C. Como padrão foi utilizado etileno 100 ppm.

### 2.6.2. Atividade da nitrogenase em meio semi-sólido

A atividade da nitrogenase em culturas cultivadas em meio semisólido foi feita em frascos de 10 mL, contendo 4 mL de meio NFbHP. Após 24 horas de incubação em estufa a 30°C ou quando a película de bactérias alcançou a superfície do meio, os frascos foram fechados com rolha de borracha e acetileno (10% de fase gasosa) foi injetado. As culturas foram incubadas a 30°C por 1 hora e determinada a atividade da nitrogenase, como descrito no ítem 2.6.1.

# 2.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas de células intactas foi determinada pelo método de LOWRY *et al.,*. (1951) após lise das células com NaOH 0,5mol/L por 30 minutos à temperatura ambiente.

### **2.8.** ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE

A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada de acordo com MILLER (1992) utilizando o-nitrofenol- $\beta$ -D-galactosídeo como substrato. O cálculo de atividade foi feito utilizando a fórmula abaixo.

```
Unidade Miller = 1000 \times DO_{420} - 1,75 \times DO_{550}
T x V x DO<sub>550</sub>
```

Onde:

 $DO_{420}$  e  $DO_{550}$  são as absorbâncias da mistura de reação no comprimento de onda 420 e 550 nm respectivamente;

DO<sub>550</sub> é a absorbância da cultura em 550nm; T é o tempo de reação em minutos; V é o volume de cultura utilizado no ensaio (0,1mL).

### 2.9. DOSAGEM DE NITRITO

A determinação da concentração de nitrito no sobrenadante de culturas desreprimidas em meio NFbHP contendo nitrato de sódio 10 mmol/L foi determinada segundo NEYRA *et al.*, (1977). Alíquotas de 0,2 ml foram adicionadas a 2,0 ml de uma solução 1:1 (v/v) de N-1-naftil-etilenodiamino dicloreto 0,02% e sulfanilamida a 1% em HCl 3N, misturados no momento de uso. O cromóforo foi lido em 540 nm e a concentração de nitrito foi determinada usando nitrito de potássio como padrão (amônio e nitrato não interferem com a dosagem de nitrito por este método).

### 2.10. MANIPULAÇÃO DE DNA

A purificação dos plasmídeos, digestão com endonucleases de restrição, eletroforese em gel de agarose, purificação dos fragmentos de DNA do gel de agarose e ligação foram realizados como descrito (MILLER, 1992; SAMBROOK *et al.*, 1989).

# 2.11. PURIFICAÇÃO DE DNA DE BACTERIÓFAGO $\lambda$ RECOMBINANTE

A purificação do DNA de bacteriófago  $\lambda$  foi realizada como descrito (SAMBROOK *et al.,* 1989) utilizando células de *E. coli* estirpe LE392.

# 2.12. PURIFICAÇÃO DE DNA DE H. seropedicae

DNA de *H. seropedicae* foi purificado a partir de células crescidas em meio NFbHPN20 até D.O<sub>550</sub> =1,0. Alíquotas de 1 ml de células foram concentradas por centrifugação de 1 min, ressuspensas em 400  $\mu$ l de GET (glucose 5 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L) e incubadas por 10 min a temperatura ambiente com 50  $\mu$ g/ mL de lisozima. Após este período foi acrescentado SDS 2%, 100  $\mu$ g/mL de proteinase K e incubado 37 °C durante uma noite. O material foi extraído com 200  $\mu$ l de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado por 10 min. O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol, lavado com 1 ml de etanol 80% e seco ao ar.

# 2.13. TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS EM BACTÉRIAS

Os plasmídeos foram transferidos para estirpes de bactérias por eletroporação ou conjugação.

#### 2.13.1. E. coli

Preparação de células eletrocompetentes e conjugação em estirpes de *E. coli* foram realizados segundo descrito (SAMBROOK *et al.,* 1989).

### 2.13.2. H. seropedicae

Para eletroporação de plasmídeos em *H. seropedicae*, células eletrocompetentes foram preparadas como descrito a seguir.

As células de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHPN20 contendo antibióticos apropriados. Culturas com D.O.<sub>550nm</sub> entre 1,4 e 1,6 foram centrifugadas por 1 min, e as células foram lavadas com glicerol 10%. Após centrifugação as células foram ressuspensas 1:500 (glicerol:volume da cultura) em glicerol 10% e estocadas a -70°C.

A eletroporação foi feita nas seguintes condições: 4 kv, 200  $\Omega$ , 330  $\mu$ F. A recuperação das células foi feita em 1 mL de meio NFbHPN20, em frasco de 10 mL, sob agitação de 130 rpm a 30°C por 6 horas. Após este período alíquotas das células foram plaqueadas em meio NFbHPN20 contendo os antibióticos apropriados.

Para conjugação simples *H. seropedicae* foi receptor e a estirpe de *E. coli* S17.1 foi doadora de plasmídeo. A mistura *H. seropedicae : E. coli* (10:1) foi plaqueada em meio NFbHPN20/LA (3:1) e incubada a 30°C por 24 horas. A mistura de células foi raspada, ressuspensa em 1 mL de meio NFbHPN20 e plaqueada em meio sólido NFbHPN20 contendo os antibióticos apropriados. Transconjugantes cresceram depois de 48 a 72 horas de incubação a 30°C.

### 2.14. HIBRIDIZAÇÃO DE DNA

### 2.14.1 Hibridização em placa

O banco genômico de *H. seropedicae* construído em vetor  $\lambda$ EMBL3 (MACHADO *et al.,* 1996) foi plaqueado e posteriormente transferido para membrana de nylon. As membranas recortadas e marcadas foram colocadas sobre as placas contendo as placas de lise por 1 min e depois colocadas em solução de desnaturação (NaCl 1,5 mol/L, NaOH 0,5 mol/L) por 7 minutos, solução de neutralização (Tris.HCl pH 7,5 1 mol/L, NaCl 1,5 mol/L)

por 6 minutos e, finalmente com a solução de transferência (NaCl 3mol/L, citrato trissódico 0,3 mol/L; pH 7,2) por 2 minutos.

O DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta (312 nm) por 5 minutos.

A pré-hibridização foi em tampão de Tris-HCl pH 7,5 50 mmol/L, contendo SDS 7%, por 30 minutos a 65°C. A hibridização foi feita acrescentando-se a sonda marcada com <sup>32</sup>P, a 65°C, durante 12-24 horas.

As sondas consistiam de fragmentos de DNA purificados em gel de agarose de baixo ponto de fusão e foram marcadas com  $[\alpha {}^{32}P]dCTP$  usando o kit Megaprimer DNA Labelling System (Amersham).

Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes com solução de alta estringência (SSC 0,1X; SDS 0,1%) a 65°C por 30 minutos e expostas a filme de raios-X (KODAK X-OMAT).

# 2.14.2. Hibridização de DNA separado por eletroforese em gel de agarose

DNA plasmidial, cromossomal ou de bacteriófagos foram digeridos com endonucleases de restrição e submetidos à eletroforese em gel de agarose.

Os fragmentos de DNA foram transferidos a vácuo para uma membrana de nylon utilizando sistema vaccum blot da Pharmacia Biotech. O gel foi tratado com solução de depurinação (HCI 0,25 mmol/L) por 5 minutos, solução de desnaturação (NaCl 1,5 mol/L, NaOH 0,5 mol/L) por 10 minutos, solução de neutralização (TrisHCI- pH 7,5 NaCl 1,5 mol/L) por 10 minutos e finalmente com a solução de transferência (NaCl 3 mol/L, citrato trissódico 0,3 mol/L pH 7,2) por 30 minutos.

A pré-hibridização e hibridização foram feitas como descrito no ítem 2.14.1.

### 2.15. SEQUENCIAMENTO DE DNA

### 2.15.1. Deleções

Os fragmentos de DNA de *H. seropedicae* subclonados em vetor apropriado para sequenciamento foram deletados nas duas direções com Exonuclease III (HENIKOFF, 1984).

### 2.15.2. Preparo de DNA de fita dupla

Os clones selecionados após a deleção foram preparados para a reação de sequenciamento. O DNA foi isolado usando método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) e então incubado com RNAse (0,1 mg/mL), a 37°C, por 1 h, em um sistema de 100  $\mu$ l. Depois o sistema foi desproteinizado duas vezes com 20  $\mu$ l de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), centrifugado, precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco a vácuo.

Alternativamente foi utilizado DNA purificado com o kit Qiagen de purificação de DNA plasmidial.

### 2.15.3. Reação de sequenciamento

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método descrito por SANGER *et al.* (1981) utilizando dideoxinucleotídeos fluorescentes, separação em eletroforese capilar e detecção do fluoróforo após excitação com laser em sequenciador automático ABI 310 da Perkin Elmer. Para incorporar os dideoxinucleotídeos 100 ng de DNA de fita dupla purificado foi colocado em um sistema de reação contendo 10 pmol de primer, 8 µl de terminator mix (Perkin Elmer) e água Milli-Q suficiente para 20 µl. O sistema foi amplificado em termociclador Perkin Elmer com a programação: 95°C 5 min e 30 ciclos de 96°C 30 seg, 40°C 30 seg, 65°C 6min. A seguir, a mistura de reação foi transferida para um novo tubo contendo 7 µl de acetato de amônio (7,5 mmol/L) e 70 µl de etanol absoluto e incubada por 15 min em gelo. Após centrifugação por 20 min, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, o precipitado lavado com 500 µl de etanol 80%, e secado a vácuo. O DNA foi ressuspenso em 15 µl de tampão TSR (template supressing reagent) fornecido pela Perkin Elmer, desnaturado a 95°C por 2 min e colocado em sequenciador automático.

### 2.15.4. Edição e análise das sequências

As sequências parciais foram alinhadas e editadas com auxílio do programa Auto Assembler (Perkin Elmer). A presença de possíveis regiões codificadoras de proteínas (ORF), na sequência de nucleotídeos obtida, foi determinada pelo método de uso preferencial de codons do programa Analyseq (STADEN, 1983) e uma tabela de uso de codons obtida a partir de sequências de genes de *H. seropedicae* recuperada de banco de dados GeneBank. A sequência de nucleotídeos foi analisada pelo programa Blast (ALTSCHUL *et al.,* 1997). A comparação de sequências de aminoácidos foi feita utilizando programa Clustal W (THOMPSON *et al.,* 1994). O alinhamento obtido do programa Clustal W foi submetido ao programa Antheprot (DELEAGE *et al.,* 1999) no qual se obteve a sequência de aminoácidos idênticos e similares indicados por diferentes cores.

A percentagem de identidade e similaridade nas comparações das proteínas foram obtidas com auxílio do programa Multialin (CORPET, 1988).

A busca de sítios ou domínios característicos nas proteínas foi feita utilizando programa Proscam (BAIROCH *et al.,* 1997).

### 2.16. OBTENÇÃO DE MUTANTES DE H. seropedicae

Mutantes de *H. seropedicae* foram obtidos por inativação utilizando-se transposon  $\lambda Tn 5$ -B20, cassete *lacZ*Km ou cassete Km.

### 2.16.1. Mutante nifN

A estirpe mutante *nifN* de *H. seropedicae* foi construída subclonando-se o fragmento *Eco*RI de 4,0 Kb no vetor suicida pSUP202 (SIMON *et al.*, 1983), originando o plasmídeo pSGK4.0. Este plasmídeo foi transformado em *E. coli* estirpe S17.1 e mutagenizado com o fago  $\lambda$  Tn*5*-B20, como descrito (BRUIJN e LUPINSKI, 1983). Foram obtidas aproximadamente 1000 colônias, que cresceram em meio contendo canamicina (50 µg/ml) e que foram raspadas das placas. A massa de células obtida foi conjugada com *E. coli E. coli* DH5 $\alpha$ . As colônias obtidas foram selecionadas e analisadas por restrição com endonucleases para identificar a presença de plasmídeos contendo o transposon Tn*5*-B20.

Um plasmídeo contendo o transposon no gene *nifN*, em orientação contrária ao sentido de transcrição do gene, foi selecionado após a análise do mapa de restrição. Este plasmídeo, denominado pSGK4.0.23, foi eletroporado em *E. coli* S17.1 e conjugado com *H. seropedicae.* As colônias resistentes à canamicina (500 µg/mL) e sensíveis a tetraciclina (marca do vetor 10 µg/mL) foram selecionadas.

As colônias selecionadas foram crescidas em meio NFbHP semisólido e a atividade de nitrogenase determinada. Para se localizar o ponto de inserção no cromossomo bacteriano, o DNA total do possível mutante foi isolado, digerido com endonuclease *Eco*RI e hibridizado em condições de alta estringência com o plasmídeo pSGK4.0.23 (*nifN*::Tn5-B20).

### 2.16.2. Mutante nifX

Os mutantes *nifX* de *H. seropedicae* foram obtidos por inserção de cassete de canamicina do plasmídeo pUC4K (Pharmacia).

O cassete de canamicina isolado com a endonuclease *Sac*I foi ligado ao plasmídeo pSGK4.0 no sítio *Sac*I localizado no gene *nifX*. Foram obtidos plasmídeos denominados pSGK4.0.1 (cassete no mesmo sentido de transcrição do gene *nifX*) *e* pSGK4.0.2 (cassete em direção de transcrição oposta ao gene *nifX*).

Os plasmídeos foram eletroporados em *H. seropedicae* e os mutantes foram selecionados para o crescimento em canamicina (500 μg/mL). Para localizar o ponto de inserção no cromossomo o DNA do possível mutante foi isolado, digerido com endonuclease *Eco*RI e hibridizado com o plasmídeo pSGK4.0.1.

# 2.16.3. Mutante na orf1

A estirpe mutante na *orf1* de *H. seropedicae* foi obtida inserindose, no mesmo sentido de transcrição, um cassete *lacZ*Km do plasmídeo pKOK6.1 (KOKOTEK e LOTZ, 1989).

O cassete digerido com *Pst*I foi inserido no sítio *Nsi*I da *orf1* contida no plasmídeo pTGK1.3, originando o plasmídeo pTGK1.3.1, que foi introduzido em *H. seropedicae* por eletroporação.

O possível mutante foi selecionado pelo crescimento em canamicina (500 μg/mL). A inserção foi confirmada por hibridização do DNA total, digerido pela endonuclease *Eco*RI, com o plasmídeo pTGK1.3.1.

Para determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase, *H.* seropedicae foi cultivado em meio NFbHPN2 por 16 horas sob agitação (120 rpm) e a 30°C. A cultura foi então centrifugada e ressuspensa em meio NFbHP com cloreto de amônio 20 mmol/L ou isento de nitrogênio e ainda em presença de 20% (+  $O_2$ ) ou 1,5% (- $O_2$ ) de oxigênio. Atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada duas e quatro horas após a incubação das culturas nestas condições.

### 2.16.4. Mutante nifQ

A estirpe mutante *nifQ* de *H. seropedicae* foi obtida inserindo-se, em sentido contrário de transcrição, um cassete *lacZ*-Km do plasmídeo pKOK6.1 (KOKOTEK e LOTZ 1989).

O cassete digerido com *Bam*HI foi inserido neste mesmo sítio localizado no gene *nifQ* do plasmídeo pTGK3.7, originando o plasmídeo pTGK3.7.1, que foi introduzido em *H. seropedicae* por eletroporação.

O mutante foi selecionado pelo crescimento em canamicina (500 µg/mL) e pela deficiência de crescimento em nitrato de sódio 10 mmol/L como fonte de nitrogênio. A mutagênese foi confirmada por hibridização do DNA total, digerido por *Bam*HI com o plasmídeo pTGK3.7.1.

### 2.16.5. Mutante modA

A estirpe mutante no gene *modA* de *H. seropedicae* foi obtida pela inserção, no mesmo sentido de transcrição, de um cassete de Km obtido a partir do vetor pUC4K (Pharmacia).

O cassete digerido com *Sac*I foi inserido no sítio *Sac*I, no gene *modA* contido no plasmídeo pTGK3.7. Foi obtido o plasmídeo pTGK3.7.2, que foi eletroporado em *H. seropedicae*.

O mutante foi selecionado pelo crescimento em canamicina (500 µg/mL) e deficiência de crescimento em meio contendo nitrato de sódio 10 mmol/L como fonte de nitrogênio. A inserção no gene foi confirmada por hibridização do DNA total do mutante, digerido com *Eco*RI e *Sal*I, com o plasmídeo pTGK3.7.2.

# 2.17. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA ESTUDOS DE COMPLEMENTAÇÃO

Para estudo de complementação dos mutantes foi construído o plasmídeo pLGK4.0, que contém o fragmento *Eco*RI de 4,0 Kb no vetor de ampla faixa hospedeira pLAFR3.18 (MACHADO *et al.,* 1995), inserido no mesmo sentido de transcrição do promotor p*lac* do vetor.

## 2.18. ANÁLISE DE POSSÍVEIS REGIÕES PROMOTORAS

Para análise de possíveis regiões promotoras foram feitas construções em vetores de fusão transcricional pPW452 (P.Woodley) ou pMP220 (SPAINK *et al.,* 1987). Estes vetores contêm o gene *lacZ*, que expressa a enzima  $\beta$ -galactosidase sem sua região promotora.

# 2.18.1. Análise da região intergênica nifK-nifE

O fragmento *Sal*I-*Eco*RI de 1,2 kb, obtido a partir do plasmídeo pTGK1.2 contendo a possível região promotora entre os genes *nifKnifE* foi subclonada no vetor pPW452 (P.Woodley). O plasmídeo originado, pPGK1.2, foi eletroporado em *E. coli*, estirpe YMC10 (BUENO *et al.*, 1985), contendo o

plasmídeo pMC71A (contém o gene *nifA* de *K. pneumoniae* expresso constitutivamente) e em *H. seropedicae*.

Para determinação da atividade  $\beta$ -galactosidase, *E. coli* foi cultivada em meio NFDM, suplementado com 2 mmol/L ou 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio, tiamina (5 µg/mL) e ainda em presença de 20% (+ O<sub>2</sub>) ou 1,5% (-O<sub>2</sub>) de oxigênio.

Para determinação da atividade  $\beta$ -galactosidase em *H.* seropedicae SMR1 foi realizado como descrito no ítem 2.16.3.

### 2.18.2. Análise da região intergênica nifQ-modA

A possível região promotora entre os genes *nifQmodA* foi subclonada como fragmento *Eco*RI-*Pst*I de 1,0 kb, obtido a partir do plasmídeo pTGK3.7, em vetor pMP220 (SPAINK *et al.*, 1987).

O plasmídeo originado pMGK1.0 foi eletroporado em *H.* seropedicae SMR1 e na estirpe mutante *modA* de *H. seropedicae*. Foi determinada atividade de  $\beta$ -galactosidase utilizando meio sem molibdênio e procedeu-se como descrito no ítem 2.16.3. Foi utilizado um pré-inóculo que havia sido repicado quatro vezes em meio sem molibdênio.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 3.1. ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGO RECOMBINANTE CONTENDO A REGIÃO A JUSANTE DOS GENES *nifHDK* DE *H. seropedicae*

Um banco genômico de *H. seropedicae* construído no vetor  $\lambda$ EMBL3 foi utilizado para isolar os genes localizados a jusante dos genes *nifHDK* (MACHADO *et al.*, 1996). Este banco contém fragmentos de DNA de aproximadamente 14 kb inseridos no sítio *Bam*HI do vetor  $\lambda$ EMBL3.

O banco genômico foi hibridizado com uma sonda *Sal*I de 2,2 Kb, que contém os genes *nifDK* de *H. seropedicae* (MACHADO *et al.*, 1996). Trinta e oito placas virais hibridizaram com a sonda e seus bacteriófagos foram isolados.

DNA viral dos trinta e oito clones de bacteriófagos foram isolados, digeridos com a enzima *Sal*I e hibridizados com uma sonda contendo o gene *nifH* de *H. seropedicae*. Um bacteriófago incapaz de reagir com o gene *nifH* foi isolado e denominado  $\lambda$ GK10. O perfil de restrição e hibridização de seu DNA com os genes *nifDK* de *H. seropedicae* está mostrado na Figura 5. O DNA do fago  $\lambda$ GK10 digerido com *Eco*RI apresentou dois fragmentos, um ligado ao vetor e outro de aproximadamente 1,2 kb, que hibridizaram com os genes *nifDK* de *H. seropedicae*. Quando o bacteriófago  $\lambda$ GK10 foi digerido pelas enzimas *Eco*RI e *Sal*I, apenas o fragmento de 1,2 kb hibridizou com a sonda *nifDK*. Estes resultados indicaram que o bacteriófago  $\lambda$ GK10 possui os genes *nifDK* de *H. seropedicae* localizados numa extremidade do inserto ligados ao vetor e a região a jusante dos genes *nifHDK* de *H. seropedicae*.



- Figura 5. Localização de fragmentos de DNA do fago λGK10 contendo os genes nifDK de H. seropedicae. O DNA do bactenófago λGK10 foi digerido com EcoRI ou EcoRI mais Sall, submetido à eletroforese em gel de agarose, transferido para membrana de nylon e hibridizado com sonda contendo os genes nifDK de H. seropedicae
  - A perfil de hibridização do fago \lambda GK10 com os genes nifDK de H. seropedicae
  - B perfil de restrição do fago λGK10
  - 1 DNA do fago digerido por EcoRI
  - 2 DNA do fago digerido por EcoRI mais Sall
  - 3 Marcador de peso molecular (kb)

# 3.2. SUBCLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO A REGIÃO A JUSANTE DOS GENES *nifHDK* DE *H. seropedicae*

O DNA do bacteriófago  $\lambda$ GK10 foi mapeado com diversas enzimas de restrição. Os fragmentos *Sal*I-*Eco*RI de 1,2 kb (pTGK1.2), *Eco*RI de 4,0 kb (pTGK4.0), *Kpn*I-*Bam*HI de 3,4 kb (pTGK3.4) e *Eco*RI-*Sal*I de 3,7 kb (pTGK3.7) foram subclonados em vetor pTZ19/18R para sequenciamento (Figura 6).



Figura 6. Mapa de restrição da região a jusante dos genes nifHDK em H. seropedicae. Em azul está representada a região contendo os genes nifHDK (MACHADO et al., 1996). Em destaque a região de DNA contendo os genes nifDK que foram utilizados como sonda. A linha pontilhada representa a região de DNA contida no bacteriófago λGK10. Na parte inferior do mapa são mostrados os fragmentos de DNA subclonados e nomeados os plasmídeos originados.

Sítios de restrição: S, Sall; E, EcoRl; Sc, Sacl,; K, Kpnl; B, BamHl; P, Pstl.

# 3.3. SEQUENCIAMENTO DOS GENES nifENXorf1orf2

Os plasmídeos pTGK1.2 e pTGK4.0 foram submetidos a deleções sequenciais de 200 a 300 pb e os subclones obtidos foram sequenciados nas duas orientações pelo menos duas vezes.

O alinhamento utilizando o programa Auto Assembler (Perkin Elmer) resultou em uma sequência de 5249 nucleotídeos (Figura 7). Esta sequência está depositada no European Molecular Laboratory Sequence Database (EMBL), sob referência nº AFO 88132. A análise da sequência de nucleotídeos revelou a presença de 5 possíveis regiões codificadoras de proteínas (ORFs) (Figura 8).

A comparação da sequência de nucleotídeos com o banco de dados do GeneBank mostrou que o plasmídeo pTGK1.2 contém a região 3' do gene *nifK* e a região 5' do gene *nifE*. O plasmídeo pTGK4.0 continha sequências similares à região 3' do gene *nifE* e aos genes *nifN*, *nifX*, além de duas ORFs, *orf1* e *orf2*.

### 3.3.1. Genes nifEN

A primeira ORF, localizada a 364 pb do gene *nifK*, codifica para uma proteína de 561 aminoácidos, similar ao produto do gene *nifE* de *B. japonicum* (52% de identidade e 65% de similaridade) (AGUILAR *et al.*, 1990) e de *Rhizobium sp.* NGR234 (46% identidade e 61% de similaridade) (FREIBERG *et al.*, 1997). O possível códon de iniciação para o gene *nifE* é precedido de um sítio de ligação de ribossomo (AGGGA) e nenhuma sequência de promotor *nif* ou qualquer outro promotor conhecido foi identificada na região intergênica *nifK-nifE* de *H. seropedicae.*  A segunda ORF tem início 11 pb a jusante do gene *nifE* e codifica para uma proteína contendo 443 aminoácidos, com similaridade com a proteína NifN de *B. japonicum* (46% identidade, 61% similaridade) (AGUILAR *et al.*, 1990) e *Rhizobium sp.* (41% identidade, 57% similaridade) (FREIBERG *et al.*, 1997). O códon de parada de leitura do gene *nifE* (TGA) se sobrepõe ao provável sítio de ligação de ribossomo (GAGGAG) do gene *nifN.* 

A comparação das proteínas NifN-NifE e NifK-NifD de *H.* seropedicae mostrou que possuem aminoácidos conservados de forma similar àquelas proteínas de outros diazotrofos (DEAN e BRIGLE, 1985; AGUILAR *et al.*, 1990) (Figuras 9 e 10). A similaridade observada entre essas proteínas tem levantado a hipótese de relação evolucionária entre elas (DEAN e BRIGLE, 1985; AGUILAR *et al*, 1990). Estas proteínas apresentam resíduos de cisteínas conservadas em domínios hidrofóbicos, que provavelmente determinam a conformação essencial na função dessas proteínas (BRIGLE *et al.*, 1987; AGUILAR *et al.*, 1990). As proteínas NifE e NifN formam um tetrâmero envolvido na biossíntese do FeMoco (PAUSTIAN *et al.*, 1989) provavelmente através da formação de um molde para construção do cofator.

A similaridade estrutural destas proteínas sugere que as proteínas NifE e NifN também participem na formação de intermediários essenciais para a biossíntese do cofator FeMoco em *H. seropedicae*.

Docultadoc	~	Discussão	E1
Resultados	e	DISCUSSão	21

TTCCGTACCCCTCGGAAATGCCCAATCCCGGCTCGTTGGCTAGGGCAAA	:	500
AACCTGATTTATTCCCCTTCCGAAAGTTCCTTCCCGCTTAAATCCAGGAG	:	550
TTGAACTTCCATCCACACGGAGAAGACGGAATGTTTCCACTCTGAGAAAT	:	600
CCTTTCCACTTCGTGATCCCGAACCTCCGGTTTACCTCTAGAATAAACCA	:	650
ACTCTACCGGCCATCTTAAGGAGAAGGATTTCAGGGAAGGGCGAATCTTG	:	700
GACCACACCTTGAAGGAAGATGTGCAGCATCTGCCCTGCAGAGGTGAGAC	:	750
CCACTTTGAAAGATGAAGGACTAGGCATTGGGAGCAAAATGGAGACCTTA	:	800
TTTGGTTGAGATGGCAGGGAGAATTGGGAAGGAAACCCCGGGTAAGGCAA	:	850
nifE		
GGGAGGGATTCAGAGAGGGCATGGGTGGAAAAACTCCCCGGAATTTTTTGG	:	900
AAGGCACCCCCGGCCGGACGGAACAGGCCCAGGAGGAGAAAGCCCGGCA	:	950
GGCCCGGGTGCAGGCCAAGCAGTGGCACCCGGGCGGCAGCGCCGGCCG	:	1000
TGGGCCTGGAAGGCGCCAAGATCGCCTTGCAGCCGTGGACCTGGCCCTTG	:	1050
GTGCATGGCCCGATCGCCTGCGAAGGCAATTTCCTGGGCTACCCGCCCTG	:	1100
CGGCCTGCGTCCCGGCGTCCAGACCTACCGCACCGGCTTTACCACCGACA	:	1150
EcoRI		
TCAACGAGCTGGACGTCATCTACGGCGGCGAATTCCGGCTGTACAAGGCG	:	1200
GTCAAGGAAATCATCGAAAAATACGAACCGCCGGCGGTGTTCGTCTACCA	:	1250
GACCTGTGTCACCGCCTGACCGGCGACGACATCGATGCCGTCTGCAAGG	:	1300
CCGCCAGCGCCAAGTTCGGCAAGCCGGTGATCCCCGTCAATTCGCCCGGC	:	1350
TTTGCCGGCGTCAAGAACCTGGGCAACAAGCTGGCCGGCGAAGCCCTGCT	:	1400
GGATTACGTGATCGGCCGGTCGAACCTGACCCCCTGCGACATCAGCATCA	:	1450
TCGGCGAATACAACCTGTCCGGCGAGTGGTGGCAGACCACCCCTGGCCC	:	1500
GACGCCGTGGCCGTGCGGGCGCCGTCCTGCATCTCCGGCGGCGGCCGCTG	:	1550
TCGCGAGAATGCCTGTTCCCCGCCGGCCCGCGCCTCGAAGACCTGTTCCA	:	1600
AGGCCATGATCAACGGCGGCGCGCGCAGGAATGGCGGTCCGTGATGGGCTTC	:	1650
CTGTTTGAAGGCTCCTTCTACGGCATCGGCGACGTCTCCGAATCGTTGCG	:	1700
CCAGATCGCGCGCCTGCTGGTGCAGCAGGGCGGCGCCAGCGAATTGATGG	:	1750
ACCGCACCGAAGCCTTGATCGCGGTGGAAGAGGCGCGCGC	:	1800
$\tt CTGGCGCATTACAAGAAACGCCTGGCGGGCAAGCGCGTGCTGGAGAAGGA$	:	1850
CCGCCGCTGTGAAGTGCTGGTGTCCCGGCGGCGGCCTGGCCGGCC	:	1900
ATCGCAAGGGCTGCTGTAAGAAACGGACCCCCGAGGTCCGTGGCTCCGCC	:	1950
TTCTGGCAGACCCGGGGCGGCGAAGAGCCCCACCTGATCGACGACATGAA	:	2000
ACCGCGGCGGGACGTGTTCCATGTGGAACGCGGCGCCCTGCCCGACTACC	:	2050
TGGGCCGGCTGTCGCGGATCGCCGGCCGTTCGCAGTTCATCGCGCTGAAG	:	2100

nifK (região-3') → SalI

GCCCGGATGCCCTGGCTGGACGTCAACCAGGAGCGCCATCACGCCCATGC	:	2150
CGGCTACGAGGGCATGATCACCCTGGTCTCGGAAATCGACCGGCGCTCCG	:	2200
TGCGCCCCGGCGTGGGCGCCTGCGCGCGCGCACCGAGCGCCTGGTGTCCTCC	:	2250
CGCATGGCCACCTCCGGCCTGCTGCGCGGCCGGGCCGGTCCACCCGCTC	:	2300
CCGCTGTGCCGCCGTGGGCCGCGGCGGATGCCGCCCGGAACGCTGCA	:	2350
TGCCGGTCATCCATGGCTCGCAGTTGTACTCCTTCGGCCTGGTCTTGTGG	:	2400
TGCTCCTTCCGCGAACGGTCCTTGCGGCACGCCTACCAGGTTCACATCTG	:	2450
GCGGATGGAAAGCCAGAAGCGCTGGAATCGCTCGGCCAGCGACAAGTGGG	:	2500
AGCAGCTGCGTCAGCCCTCTCCATGGGAGGCGTTGGCCCAAGCGCCCGAG	:	2550
nifN		
CAGTGAGGAGTCGCCAATGCCCTCCGCCAGCCTGAAGGCCGCCGCCG		2600
TGAACGCCCTGAAGATGTCCCCAGGTGGGGGGGCGCCTGTGCCCGGC	:	2650
ATGAACCGCTACATGCCCGTCATGCACGGCGCCCAGGGCTGCACCTCCTT	:	2700
CGGCCTGGTGTTGCTGGTGCGTGATTTCCCGCGAAGCGATTCCCTTGCAGA	:	2750
CCACCGCCATGAACGAGGTCTCCTCCACCCTGGGGGGGCATGGAGAACATC	:	2800
GCCAAGGCGGTCTTGAACATCCGCCTGCGCGCCAAGCCGGGCCTCATCGC	:	2850
CATCTGTTCCACCGGCCTGACCGAAACCAAGCGCGATGACGTCAATCCCT	:	2000
ATCTCCCCCTCACCCCCACCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	:	2950
	:	2950
CIGIGICCCCACGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	:	2050
CCCCCCA CCCCCACA A TOTOCOTOCCCCCCCCCCCCC	:	2100
	•	2150
	:	3200
CITICCGGACGIGICCAGCIGGCICGACGGCCAICIGCCGGACAACIICA	:	2250
CCCTCCATCCTCTCCCCCATCCCCCCCCCCCCCCCCCC		3230
		3300
	:	3350
	:	3400
	:	3450
GGACGCCAIGCIGGCCIIGCCCIIGCIICGGCCCGGCGIGAAGGICG	:	3500
	:	3550
	:	3600
	:	3050
	:	3700
TGCTGGTTGACCCACTCGCACGGCGGCCAGGCGGCCGAGCGTCTGCACAT	:	3750
TCCCTTCCACCGTGCCGGCTTGCCCCCGTGTTCGACCGGTCTGGGCGCCG	:	3800
GCCACTGTCTGTCGGTCGGCTACCGCGGCACCCGTGGATTGATT	:	3850
ATCGGCCAGCCTGTCGCGGGCCGCGGGCCATGCACATACCCCGGATGACT	:	3900
GGCAGCTGCCCGGAAGAAGCGGGCCATGCCCTGGCGCTGGCCGCGCCCGT	:	3950
TCAAGGAGAAAGCCATGAAAGTGGCGTTTGCAACCCAGGAACTGCAGCGC	:	4000
SacI		
GTGGAAGCGCATTTCGGCTGGGCCAAGAACCTGGCGGTGTTC <b>GAGCTC</b> TG	:	4050
GCCCAACGGCTACAGCTTCGTGCAGACCCACAGCTTCGACGGCGACCTGA	:	4100
AGGAGGACGGCGACGAAGACAAGCTGGCCCCCAAGATCGAGGCCATCAAG	:	4150

GAATGCGCCATTCTGTACGTCGCCGCCATCGGCGGCTCGGGCGCGCGC	:	4200
GGTGGTGGCCAACCGTATCCACCCGGTCAAGGTGGCGCAGGCCGAACCGA	:	4250
TCCTGGACATCCTGGACAAGCTGCAGGAAGTGCTGAAGGGCACCCCAGCA	:	4300

CCGTGGCTGCGCAAGGCCATGCAGAAGGGCCAGGAACGCGTCATCAACTT : 4350

orfl		
CGAAGAAGAAGTGTGAACCATGACCGCCATCGCCACCCAGGAGGCCCCGG	:	4400
CCGCCATTGACAGCCCCTTCGTGCAGGAGCTGATCAAGCAGTGGCGGGCG	:	4450
CAGGACACCCATGGCGCCTGGGACGGCAAGAGCAACGCCGACCTGCTGGC	:	4500
CCCCTACATCATCACCCGCGAGCAGCGCCGCGAAATTCCCATCATCGGCG	:	4550
ACCCCGACCCCGAAACCCTGTGGCGCCTGGTGACCGTGCTGCAGCGCCGG	:	4600
GGCGCGTGGCGCTCCGAACCCCCGACCGGCAGCATCGCCACGCCGAAGA	:	4650
CGAAGAAGTGCGCAACGCGGGCTTCGGCCGCATGGTGCTGATGCATGGCC	:	4700
GCCTGGTGGTGGTGAACAAGGCCCTGGCGGGGCGAAGTGCACCGCTTCGGC	:	4750
TTCGAGTCCGTGGGCCAGGCCGGCCGCGGCGGCCACAAGATCGTGACCGC	:	4800
CGGCGTGGAGATGATCCGGCAGTTCCCCGAAGTGGTGAACTACGGCCTGT	:	4850
orf2		
GAGGCATTGGCCACAAGGAGGACGGGTTGATGTCGCGCTCCTGGCCCTTC	:	4900
TGCATGGCCCTGCGCCCGGCCCCGGTGCTGGTGTGCCCTGGAACACTTCCT	:	4950
GCAGCTGGTGGAGGAAGTCCAGGACCGGTTCGGCCTGCGCCACCTGGACC	:	5000
GGGTGGACACCGTGGGCCACCACCCCGCATCGCCCCCAGGGCGCCACC	:	5050
GAAATCTCCCGCCCTCGCCCACCGTGACCATTGCCTCGGTGGCGCGGCC	:	5100
KpnI		
CGCCCACGGCTTCGTGCCCCGGTACCCCACCCCATGGGCTCCGCGCAGG	:	5150
TCTGCTCGTCCATTTCCCTGTGAGCATTGCCTTGCCCTTGCACGGGTCGA	:	5200
EcoRI		
CCACCTCAATACCGATGAAGTGCACTTCATCGTGCAGGCGGCCGAATTC :		5249

Figura 7. Sequência de nucleotídeos dos genes nifK (região-3') nifENXorf1orf2 de H. seropedicae. O início de cada gene (ATG) está destacado em azul. Os sítios de ligação para ribossomo estão sublinhados. Os códons de terminação (TGA) estão mostrados em vermelho. Os sítios de restrição relevantes são mostrados em verde. As setas indicam a direção de transcrição.



Figura 8. Identificação das prováveis regiões codificadoras de proteínas a jusante dos genes nifHDK de H. seropedicae. A sequência de nucleotídeos obtida foi analisada pelo programa Analyseq (Staden, 1983) utilizando uma tabela de preferência de uso de códons de H. seropedicae. Estão representados os genes nifK(região 3') nifENXorf1orf2. Cada seção do gráfico representa uma fase de leitura. Os códons de terminação estão representados por um traço vermelho no centro de cada seção. O primeiro aminoácido de cada ORF (metionina) está representado pela letra M na parte inferior de cada seção.

1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	I I I I I I MEGKTPGIFWKAPPGRTEQAQEEKARQARVQAKQWHPGGSAG- MSSLAATVQDIFDEPGCAKNGSKSEAERRNGCTRQLQPGSAAG- MSLTVEETTARNTELINEVLKAYPDKTAKRRAKHLTTQEEGKSDCNVKSN A IF E PG K A Q Q PG AG-	42 43 50
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso		76 78 100
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	I     I     I     I     I       CGLRPGVQTYR-TGFTTDINELDVIYGGEFRLYKAVKEIIEKYEP-PAVF       AAASSGSDIWR-TAFTTDISETDIVFGGEKRLCKAIKEIIDKCDP-PAIF       YIGKTGIDSFVTMQFTSDFQEKDIVFGGDKKLEKIVDEIQELFPINKGIS       G     R-T     FTTD     E     DIVFGGEKRL KAVKEIIEK     P-PAIF	124 126 150
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	VYQTCVTALTGDDIDAVCKAAS     AKFG-KPVIPVNSPGFAGV-KNLGNKLA       VYQTCIPAMIGDDINAVCKAAS     AKFG-KPVIPINSPGFAGS-KNLGNKLA       VQSECPIGLIGDDIEAVSKKKS     KQYEGHTIVPVRCEGFRGVSQSLGHHVA       VYQTC     ALIGDDI AVCKAAS     F -KPVIPVNSPGFAGV-KNLGNKLA	172 174 200
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	I     I     I     I       GEALLDYVIGRSNLTPCDISIGEYNLSGEWWQTTPWPDAVAV       GEALLDYVIGTREPDYTTPYDINLIGEYNLSGEIWQVKPVLDELG-       NDAIKEWVLDKHDPDKNQFVATPYDVAIIGDYNIGGDAWSSRILLEEIGL       GEALLDYVIG       PD       TPYDI       IGEYNLSGE       WQ       P       LDYVIG	215 219 250
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	I     I     I     I     I       RAPSCISGGGRCRENACSPPARASK-TCSKAMINGGAQEWRSVMGFLFEG       RILCCISGDGKYREVASSHRARAAMLVCSKSMINVARKMEQRYGIPFFEG       RVIAQWSGDGTLAEMENTPKAKLNVLHCYRSMNYISRHMEEKFGIPWVEY       R     CISGDG     RE     A     SP     ARA     L     CSKSMIN     R     GIP     FEG	264 269 300
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	I I I I I SFYGIGDVSESLRQIARLLVQQGGASELMDRTEALIAVEEARAWSRLAHY SFYGIQDSSESLRQIARLLVERGAPADLLGRTEAVIAREEARAWAAIQPY NFFGPSQIEASLRQIASHFDDKIKEGAERVIAKYKALTDAVIAKY SFYGIDSESLRQIARLLV G L RTEAVIA EEARAWA IA Y	314 319 345
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	I     I     I     I       KKRLAGKRVLEKDRRCEVLVSGGGLAGGRHRKGCCKKRTPEVRGSAFW       KPRLEGKRALLMTGGVKSWSVVSALQEAGLELVGTSVKKSTMEDKERI       RPRLEGKTVMLEVGGLRPRHVIDAYGDLGMKVVGTGYEFGHNDDYQRT       KPRLEGKRVLL     GGR     VVSAGAG     VGT     KKT     ED     -     R	362 367 393

1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	QTRG <b>G</b> EE KELMGQD THYVEDG G	PHLI AHMI TLIY H I	DDMT DDVT DDVT	RRDV R-EM Y-EF R-E	FHVE YKML EKFV K	RG <b>ALP</b> KD <b>AEA</b> EKIEP AEP	DYLGE DIM DLVG D G	 LSRIAG -LSGG -SGI -LSGG	RSQF KSQF KEKY KSQF	IALKA VALKA VFQKM VALKA	 R 412 A 412 G 438
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	MPWLDVN VPWVDIN VPFRQMH VPW D N	-QER -QER SWDY -QER	HAHA HAY SGPYH HAY	 AGYEG (GYAG IGYDR GY G	MIT IVKL FAIF	VSEID VEEID ARDMD V EID	 RRSVF NSLSS MAINS S	 2PGVGAC 2P 3P 3P	ARTE -MWE -VWG - WE	RLVSS QLR MAK L	 R 461 R 453 - 479 R
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	MATSGLL PAPWEAL -APWKA- APW AL	 RGRGI AKARI	RSTR EQMQ	I SRCAA MAAI	VGRG AGDP	DAAGP VLAET A	I ERCME ARRAF R	I I I I	LYSF RVDL	GLVIW G-TIE G-	 C 511 D 502 - 484
1 2 3 4	HSNifE BJNifE HSNifD Consenso	SFRERSI AISVHGI	I RHAY( RSVA) R	OVHIV AVR V	I VRMES EH	QKRW TNAA	NRSAS GGCCQ	 DKWEQ GRIED E	I LRQPSP MIMSEP P	NEAL SD-M	QAPE QAAE QAE	 0 561 - 546 - 484

Figura 9. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifD e NifE de *H. seropedicae* (HSNifD e HSNifE) e NifE de *B. japonicum* (BJNifE). O alinhamento foi feito utilizando o programa Antheprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade; em verde, até 75% de similaridade e; em cinza com menos de 50%. Os quadros e asteriscos destacam domínios e resíduos de cisteínas conservados, respectivamente.

1 2 3 4	HSNifN BJNifN HSNifK Consenso	MPSASLLKAAAVNALKMSQ MALVTAPTKACVVNPLKMSQP MSLTVEETTARNTELINEVLKAYPDKTAKRRAKHLTTQEEGKSDCNVKSN	19 21 50
1 2 3 4	HSNifN BJNifN HSNifK Consenso	I I I *I I VGRGLCLPGMNRYMPVNHGAQGCTSFGLVLLVRD IGGAYAFMGLRGAMPLIHGSQGCTSFGLTLFVRH IKSIPGVMTIPPCAYAGSKGVVWGPIKDMIHISHGPVGCGQYSWGSRRNY GGGGMPHGQGCTSFGLLVR	53 55 100
1 2 3 4	HSNifN BJNifN HSNifK Consenso	I     I     I     I       FREAIPLQTTAMNEVSSTLGGMENIAKAVINIRLRAKR-DLIA       FREAIPLQTTAMSEVATVLGGYENLEQAIINISKRAKP-KIIG       YIGKTGIDSFVTMQFTSDFQEKDIVFGGDKKLEKIVDEIQELFPINKGIS       F       EAIPLQTTAM       EV       VLGG       ENLEKAVINI       RAK       K	95 97 150
1 2 3 4	HSNifN BJNifN HSNifK Consenso	* I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	144 147 200
1 2 3 4	HSNifN BJNifN HSNifK Consenso	I     I     I     I     I       KALEALAGRWESRGRADARQADNLLAGCHLTPADIEEMRDIVQSFGL     I       KAVARMVEVIVDRPSANGLRDPSKVNVLPGCHLTPGDIDELRALLEDFGL     I       NDAIKEWVLDKMDPDKNQFVATPYDVAIGDYNIGGDAWSSRILLEEIGL     I       KA     RP AN     N     I	191 197 250
1 2 3 4	HSNifN BJNifN HSNifK Consenso	I     I     I     I       EPIVLPDVSSWLDGHLPDNFSPTSMGGTILAEM       YPSFLPDLAGSLDGHIPDEFTSTTIGGIDVDEI       RVIAQWSGDGTLAEMENTPKAKINVLHCYRSMNYISRHMEEKFGIPWVEY       PI LPD     LDGHLPD F	224 230 300
1 2 3 4	HSNifN BJNifN HSNifK Consenso	I     I     I     I       RALGAS IVCIANRRTEAPPTAQAVQELCGVPYVVFDRLTGLQA       ASMGRAGWTIAIGAQMQRAAEVMQTKTGVPFRVFERLCGLHP       NFFGPSQIEASLRQIASHFDDKIKEGAERVIAKYKALTDAVIAKYRPRLE       G     S     IA R	267 272 350
1 2 3 4	HSNifN BJNifN HSNifK Consenso	I       I       I       I       I         NDRFLAYLEYVSGQPIPARYRQRSQLQDAMLGWPLLLRPG       Image: Comparison of the second secon	308 312 400

1	HSNifN	VKVAIGAEPEPVAVTLR	325
2	BJNifN	RKVAIGAEPDLLFDLSG	329
3	HSNifK	TLIYDDVTSYEFEKFVEKIEPDLVGSGIKEKYVFQKMGVPFRQMHSWDYS	450
4	Consenso	KVAIGAEPDLV	
1	HSNifN	HGWPRWAAELGGCRDHHDIAGARWRSPQPGWWIGANLE	363
2	BJNifN	MLHDMGAQVIVAVIITOSEVIERIRIKEVLIGDLED	365
3	HSNifK	GPYHGYDRFA IFARDMDMA INSPVWGMAKAPWKAVDLAE SQAHLHGKKFA	500
4	Consenso	HG DR A A ARWRLIG	
1	HSNifN	APGTKGARARAGAGSCWLTHSHGGQAAERLHIPFHRAG	401
2	BJNifN	LEGFAKERICDLLITHSHGRQAAGRLKVPFYRVG	399
3	HSNifK	LYGDPDMMIGMTOFLLELGCEPTHILSTNGDAEWAAKVQALLEASPRGKD	550
4	Consenso	L G FA E C LTHSHG QAA RL PF R G	
1	HSNifN	LPPCSTGLIGAGHCLSVGYRGTRGLIF	427
2	BJNifN	FPIFDRVIF	424
3	HSNifK	CKVYPKRDLWHLRSLLFTGAGGLPEROCLPASSYLERDRGSCALNPAWVF	600
4	Consenso	P D IGAG HCLSVGYRGTR IF	
1	HSNifN	EIGOPVAGRGP	443
2	BJNifN	QLANLVLAHR-DENDRPTPDFWRTTPG-LPOHVGHRRSTGAPERSIA	469
3	HSNifK	PVFRPAITNHRFPHPAGY SRCRCAVPGCMIPRRSNERTPSEMPNPGSLAR	650
4	Consenso	I PVI - P CT PG P R P	
_			
1	HSNifN	443	
2	BJNifN	469	
3	HSNifk	AKT 653	
4	Consenso		
-			

Figura 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifK e NifN de *H. seropedicae* (HSNifK e HSNifN) e NifN de *B. japonicum* (BJNifN). O alinhamento foi feito utilizando o programa Antheprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade; em verde, até 75% de similaridade e; em cinza com menos de 50%. Os quadros e asteriscos destacam domínios e resíduos de cisteínas conservados, respectivamente.
# 3.3.2. Gene nifX

A terceira ORF, localizada 28 pb a jusante do gene *nifN*, codifica para uma proteína de 146 aminoácidos, similar ao produto do gene *nifX* de *R. capsulatus* (37% de identidade e 64% de similaridade) (MORENO-VIVIAN, 1989), *A. vinelandii* (38% de identidade e 58% similaridade) (JACOBSON *et al.*, 1989) e *K. pneumoniae* (22% identidade e 38% similaridade) (ARNOLD, *et al.*, 1988).

A sequência de aminoácidos da proteína NifX de *H. seropedicae* foi comparada com a sequência de aminoácidos das proteínas NifX de *R. capsulatus, A. vinelandii* e *K. pneumoniae* (Figura 11). Observa-se a existência de um domínio compreendido numa região de aproximadamente 33 resíduos de aminoácidos incluindo um motivo His-Phe-Gly altamente conservado (MORENO-VIVIAN, 1989a). A proteína NifX de *H. seropedicae* apresenta 26% de identidade com a região C-terminal da proteína NifB de *H. seropedicae* (Figura 12) e com as proteínas NifY de *A. vinelandii* (JACOBSON *et al.*, 1989a) e de *K. pneumoniae* (ARNOLD *et al.*, 1988) 27% e 13% de identidade, respectivamente (Figura 13).

A localização do gene *nifX* em *H. seropedicae* a jusante dos genes *nifEN* (ROBERTS *et al.*, 1978; BRIGLE *et al.*, 1987; PAUSTIAN *et al.*, 1989), e também a semelhança da proteína NifX de *H. seropedicae* com NifB de *H. seropedicae* e com NifY de *K. pneumoniae* (ARNOLD *et al.*, 1988), sugerem uma possível função de NifX na biossíntese do FeMoco. A proteína NifB em *A. vinelandii* (SHAH *et al.*, 1994; ROOL *et al.*, 1995) e a proteína NifY em *K. pneumoniae* (HOMER *et al.*, 1993) são essenciais para biossíntese e inserção do FeMoco na apoproteínaMoFe. Portanto, como proposto para o produto do gene *nifX* de *R. capsulatus* (MORENO-VIVIAN *et al.*, 1989a), a similaridade da proteína NifX de *H. seropedicae* com proteínas essenciais para biossíntese do FeMoco sugere um papel desta proteína na maturação e estabilidade do cofator FeMoco.

				1	1		1	
1	HSNifX	MPWRWPRI	PFKEK	AMKVAFAT	OELORVEA	HEGWAKNLA	VFEVWPN	44
2	RCNifX	MSRTIRLVEI	AGPAPGEK	PLRVAIAS	NDLENLDA	HFGSARQIA	VYEVWKT	50
3	AVNifX	MS SPIROLON	LDSEDDGT	LKVAFAS	SDRELVDO	HFGSSRSFA	IYGVNPE	50
4	KPNifX	MPPINROFDA	IVHSDEW	SMKVAFAS	SDYRHVDO	HFGATPRLV	VYGVKAD	48
5	Consenso	MP RO I	SDEK	MKVAFAS	SDLE VDA	HEGSAR LA	VYEVWP	
			I	T	1	1	1	
1	HSNifX	GYSFVQTHS	DGDLKEDG	DEDK	LAPKIEAI	KECAILYVA	AIGGSGA	90
2	RCNifX	GAREVEVHOL	SSATDOKG	RHDELEDR	IGPKLEAL	SGCTLVFAL	AVGGPSA	100
3	AVNifX	RSOLLSVVE	G-ELEODG	NEDK	LARKIDLI	DGCVAVYCC	ACGASAV	95
4	KPNifX	RVTLIRVVD	SVENG	HQTEK	IARRIHAL	EDCVTLECV	AIGDAVE	92
5	Consenso	G FV VH I	S- L EDG	EDK	LAPKIEAL	GCV LYC	AIGGS A	
			1	1	1	1	1	
1	HSNifX	ARVVANRIHI	VKVAQAEP	ILDILDKL	QEVLKGTE	APWLRKAMQ	KGQERDI	140
2	RCNifX	ARMVRAGMHI	TKRKEPEP	ISAVIEQV	QVMLNGTE	PPFLRKVLG	TWEKPDF	150
3	AVNifX	ROLMATGVOR	TKVSEGAR	IAELIEAL	OVELREGE	SAWLAKAIO	RTRGPDM	145
4	KPNifX	ROLLOVGVR	AERVPADTT	TVGLLOEI	QLYWYDKG	ORKNOR	QRDPERF	139
5	Consenso	ARLVA GVH	PIKV E EP	I LLE L	QV L GTE	PWLRKA Q	PDF	
			1					
1	HSNifX	NFEEV		146				
2	RCNifX	TADFEEEEV-		159				
3	AVNifX	RR-FDAMAAB	EGWDE	158				
4	KPNifX	TRILOEQEWH	IGDPDPRR	156				
5	Conconco	TO PEPEE						
-	Consenso	IR-FEEE						

Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifX de H. seropedicae (HSNifX), R. capsulatus (RCNifX), A. vinelandii (AVNifX) e
K. pneumoniae (KPNifX). O alinhamento foi feito utilizando o programa Antheprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade; em azul, até 75% de similaridade; em verde acima de 50% e; em cinza com menos de 50%. O quadro mostra resíduos de aminoácidos conservados.

		I	T	1	1	1	
1 1 1 1	HSNifB HSNifB HSNifB HSNifB HSNifB HSNifB	MQPTQYVGIQD EVWEKVKNHPC GVVSEKLTPEQJ ISQTAPDIKLC IYPWIYYQNKR DQHLVEVNRAV	IKSLGTLLDK YSEEAHHHYA AAKKVFAVAS LSTNGLALPD WTGIDAARII KSRGAFLHNI	VAEHKGCGTS RMHVAVAPAC TIPQMTVLGI DHIDTIIAAI HERQMLGIEM MPLISAPEHG	SEGGKASCGS: INIQCNYCNRK IAGPGDPLANP INVDHVTITTN MLTARGILCKVI STVFGLNGQQR	SDGPADMAP YDCANESRP AKTFKTFEL MVDPEIGQH NSVMIPGIN GPSAQELKA	50 100 150 200 250 300
1 2 3	HSNifB HSNifX Consenso	I LQDACEGEMNM LQDACEGEMNM	I MRHCRQCRAD MRHCRQCRAD	AVGLLGEDRS	I SAEFTTEKIEA SAEFTTEKIEA	 MEVAYDGAT MEWRWP MEVAYDGAT	350 6
1 2 3	HSNifB HSNifX Consenso	 RKAYQELVEQE -RPFKEKAMK RKAYQELVEQE	I RQAKSAAKAA RQAKSAAKAA	I EQQELAQMAL EQQELAQMAL	 DQSGLSLLVAV VAF DQSGLSLLVAV	 ATKGQGRVN ATQELQRVE ATKGQGRVN	400 27
1 2 3	HSNifB HSNifX Consenso	 EHFGHVSEFQI AHFGWAKNLAVI EHFGHVSEFQI	i Yevssagske Fevwpngyse Yevssagske	 VGHRRVDQYO VQTHSFDGDI VGHRRVDQYO	 CQGGYGEEDAL KE-DGDEDKL CQGGYGEEDAL	 ETVIRAIND APKIEAIKE ETVIRAIND	450 76
1 2 3	HSNifB HSNifX Consenso	 CHAVLVAKIGG CAILYVAAIGG CHAVLVAKIGG	 CPKDDLQKVG SGAARVVANR CPKDDLQKVG	 IEPVDRYAHE IHPVK IEPVDRYAHE	 EFIEQSVIAYF -VAQAEPIIDI EFIEQSVIAYF	 MDYLERVRS LDKLQEVLK MDYLERVRS	500 121
1 2 3	HSNifB HSNifX Consenso	 GQIEHRPRGDA GTPAPWLRKAM GQIEHRPRGDA	 DIRQGAYTSV QKGQERDINF DIRQGAYTSV	QS REEV QS-	523 146		

Figura 12. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifX (HSNifX) e NifB (HSNifB) de *H. seropedicae*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Anteprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade.

1 2 3 4	HSNifX AVNifY KPNifY Consenso	MP MTAQPP MSDNDT M P	WRWP FGQA LEWR W	R <b>P</b> FKE PLPAH MLALF L	KAMKV LALRI QSLPD AL	AFATQ ALAAR LOPAQ A AAQ	 ELQ SLKGVDT. IVDWLAQ L	I AH <b>ILRALIAA</b> ES	VGEPITEA -GETLTPE -GE T	24 50 41
1 2 3 4	HSNifX AVNifY KPNifY Consenso	RLRKLR RLATLT RL L	I ASRL OPOL L	RTRLL	ETCGE	gvqst Satav	I RVE LTDRQLH: MSPARWS R	I AHFGWAKN SALGLLKGRG RVMASLQG G LKG	I VRMPEDPL ALPAHL L	36 100 82
1 2 3 4	HSNifX AVNifY KPNifY Consenso	AVFEVW PIPEPY RIVRPA I EP	 PNG- PNGE   QRTP NG	FQDSV QL	I RIACA LAAFC A	SDNGE SQDGL S G	 RLDGIFS VINGHFG GF	 NCTRFLIYQI QGRLFFIYAF F IY F	 TVQTHSFDG SPRESRLI DEQGGWLY SL	56 150 129
1 2 3 4	HSNifX AVNifY KPNifY Consenso	DLKEDG DLREPG DLRRYP DLRE G	I PCREJ SAPH	DEDKL DEDRH QQEAN DED	 APKIE ARRAE EVRAR A RAE	AIKEC LLADC LIEDC LI DC	I AILYVAA QLLYTLS QLLFCQE QLLY	 IGGSGAARVV IGGPAAAKVV IGGPAAARLI IGGPAAARVV	 ANRIHPVK RAGVHPVR RHRIHPMK R RIHPVK	102 200 179
1 2 3 4	HSNifX AVNifY KPNifY Consenso	VAQAEP LARARP AQPGTT A A P	ILDI AREI IQAQ I I	LDKLQ VEELQ CEAIN E LQ	 EVLKG RVLAT TLLAG VLAG	TPAPW APPPW RLPPW PPPW	i LRKAMQK LAKAMGAJ LAKGLTG LAKAM	 GQERD <b>INF</b> EE EPDQR <b>IRF</b> TQ ITLWK <b>NAF</b> FN <b>I F</b>	EV	146 242 229

Figura 13. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NifX de H. seropedicae (HSNifX), NifY de A. vinelandii (AVNifY) e NifY de K. pneumoniae (KPNifY). O alinhamento foi realizado utilizando o programa Anteprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade; em verde com 75% de similaridade e; em cinza, com menos de 50%.

# 3.3.3. orf1orf2

A quarta ORF sequenciada (*orf1*) encontra-se a 3 pb a jusante do gene *nifX*. A sequência do sítio de ligação de ribossoma (AGAAG) se sobrepõe ao códon de parada do gene anterior em 2 pares de base. Esta *orf* codifica para uma proteína com 160 resíduos de aminoácidos que apresentou similaridade com o produto da *orf4* de *R. capsulatus* (44% de identidade e 65% similaridade) (MORENO-VIVIAN, 1989a) e com a ORF3 de *A. vinelandii* (45% de identidade e 68% de similaridade) (JACOBSON *et al.*, 1989a) Figura 14.

A presença da *orf4* adjacente aos genes *nifENX* fazendo parte de um mesmo operon em *R. capsulatus* e a identidade entre as proteínas NifX e ORF4 (19%) sugeriram aos autores que em *R. capsulatus* o produto da *orf4* poderia estar também envolvido na biossíntese do FeMoco (MORENO-VIVIAN 1989a). Entretanto, o domínio conservado (próximo dos resíduos His-Phe-Gly) encontrado nas proteínas NifX de *R. capsulatus*, NifY e NifB de *K. pneumoniae* não foi observado na ORF4. Deste modo, o envolvimento desta proteína na biossíntese do FeMoco permaneceu meramente especulativo (MORENO-VIVIAN *et al.*, 1989a).

A localização da orf1 de *H. seropedicae* a jusante dos genes nifENX e a ausência do gene nifY poderia sugerir também o envolvimento do produto da orf1 com a biossíntese do FeMoco. Entretanto, a comparação entre a proteína NifX e ORF1 de *H. seropedicae* utilizando o programa Multialin (CORPET, 1988) revelou somente 15% de identidade e a ORF1 também não possui a região conservada com os resíduos His-Phe-Gly. A sequência de aminoácidos da ORF1 de *H. seropedicae* foi também analisada pelo programa Proscam (BAIROCH *et al.*, 1997) e não revelou a presença de sequências ou sítios característicos presentes no banco de dados. Também não foi detectada presença de possíveis hélices transmembrana quando analisada pelo programa Antheprot (DELEAGE *et al.*, 1999). Estas análises foram feitas também com a sequência de aminoácidos da ORF4 de *R. capsulatus* e ORF3 de *A. vinelandii,* obtendo-se o mesmo resultado. Portanto, são necessários estudos complementares para esclarecer o papel do produto da *orf1* na fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*.

A quinta ORF (*orf2*), localizada a 28 pb da *orf1*, não apresentou similaridade com nenhuma sequência codificadora de proteínas depositada no banco de genes. Quando analisada utilizando o programa Proscam (BAIROCH *et al.*, 1997) o produto da *orf2* também não revelou a presença de sequências ou sítios característicos.

1 2 3 4	HSORF1 RCORF4 AVORF3 Consenso	MTA MTMI MYYEEQQE	I LIATQEAR LIDAARGG PVVQEDD QE	i Paaidspi Emvespi Kflqdp: Spf	FVQEL FLAQL I LAQM AQLV	I IKQWRA VAVIRA VVQLRA Q RA	ODTHGA EDSHGI VDSYGI DSHG W	I WDGKSN WDDKTN YDIWSD D KSNA	ADLLAP SEILRE ARVVDP L P	45 46 50
1 2 3 4	HSORF1 RCORF4 AVORF3 Consenso	YIITREOR FIVTAEER LVLTKERR I T E F	 REIPIIG RSMPIIG RAIPVVG R IPIIG	 DPDPETI DPDPEL: DPDETT: DPDPET:	LWRLV IWRMT ISRIK IWR	 TVLQRF KFYDAI AYYNTI Y	GAWRSE GLLVEK ALLERE GLL E	 PPDROH RTGC TGL	 RHAEDE MASQMQ LAVPVI A	95 94 97
1 2 3 4	HSORF1 RCORF4 AVORF3 Consenso	evr <b>nagf</b> g Kmh <b>hegfg</b> Nit <b>hegfg</b> <b>Hegfg</b>	I RMVLMPG RVVLIAG RALILVG R VL G	I RLVVVNJ KLVVVSJ KLVALDJ	KALAG KHLR- KTLA- K LA-	 EVHRFG DVHRFG DVHRFG DVHRFG	FESVGQ FETWAK FESLEA FES	 IAGRGGH LAEAGE LVAEAN L G	I KIVTAG KLVESA KQLGKA K V A	145 143 146
1 2 3	HSORF1 RCORF4 AVORF3	VEMIRQFE VATINEFE ATLVNEHE	 PEVVNYGI PEAARA NTVAEL		160 156 159					

4 Consenso

V INEFPEVA

Figura 14. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas ORF1 de H. seropedicae (HSORF1) ORF4 de R. capsulatus (RCORF4) e ORF3 de A. vinelandii (AVORF3). O alinhamento foi feito utilizando o programa Antheprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade; em verde, até 75% de similaridade e; em cinza, acima de 50%.

## 3.4. ANÁLISE DA REGIÃO INTERGÊNICA nifK-nifE DE H. seropedicae

A análise da sequência de 5149 nucleotídeos contendo os genes nifENXorf1orf2 a jusante dos genes nifHDK de H. seropedicae não indicou a presença de promotor -24/-12 e também de nenhum outro. Para se confirmar este resultado, a região intergênica nifK-nifE foi subclonada no vetor de fusão lacZ, o pPW452, gerando o plasmídeo pPGK1.2 (Figura 15).

O plasmídeo pPGK1.2 foi transformado em *E. coli* YMC10, contendo um plasmídeo (pMC71A) que expressa o gene *nifA* de *K. pneumoniae* constitutivamente (BUCHANAN-WOLLASTON, 1981) e em *H. seropedicae* estirpe SMR1. Os transconjugantes não apresentaram atividade de  $\beta$ -galactosidase em nenhuma das condições testadas (Tabela 2A). A ausência de atividade de promotor ativado por NifA na região intergênica *nifKnifE* indica que os genes *nifENXorf1orf2* são transcritos a partir do gene *nifH*.

Em K. pneumoniae, R. capsulatus, A. vinelandii (MERRICK, 1992), A. brasilense (GALLIMAND et al., 1989; PASSAGLIA et al., 1991) os genes nifHDK(TY) são expressos a partir do gene nifH e os genes nifENX são expressos a partir do gene nifE. Entretanto, em H. seropedicae a organização dos genes nifHDKENXorf1orf2 é semelhante à organização nifHDKENX de Methanococcus maripaludis (KESSLER et al., 1998) e A. diazotrophicus (SEVILLA et al., 1997) e nifDKENX de B. japonicum (AGUILAR et al., 1990), nos quais os genes estão também organizados em um operon único.

Tentativas para se obter o transcrito íntegro do operon nifHDKENXorf1orf2 não foram bem sucedidas, possivelmente devido à instabilidade deste longo RNA mensageiro.

Em *K. pneumoniae* a proteína NifA parece estar envolvida na estabilização de transcritos *nif*. Neste organismo os transcritos *nif* são estáveis "in vivo" por aproximadamente 20-30 min, com exceção dos mRNA do operon

*nifLA* (COLLINS *et al.*, 1986). Exposição ao oxigênio ou nitrogênio fixado reduzem para 5 min a estabilidade dos transcritos somente em estirpes contendo NifL ativo. Estas observações sugerem que a proteína NifA estabiliza os transcritos *nif* e a proteína NifL inativa NifA em presença de oxigênio e amônio (COLLINS *et al.*, 1986; LEE *et al.*, 1993). Estudos mais recentes mostraram que o transcrito *nifHDKTY* em *K. pneumoniae* é instável na presença da proteína NifY (SIMON *et al.*, 1999).

Em *H. seropedicae*, não foram identificados os genes *nifL* e nem *nifY* e não são conhecidos os fatores que podem estar envolvidos na degradação do mRNA *nif*. Estudos são necessários para esclarecer as condições ideais de obtenção de longos transcritos estáveis nesse microrganismo.

# 3.5. MUTAGÊNESE DOS GENES nifN, nifX e orf1 de H. seropedicae

# 3.5.1. Mutante nifN

O gene *nifN* de *H. seropedicae* foi inativado por inserção com o transposon  $\lambda$ Tn5-B20 e obteve-se a estirpe mutante GK52. Neste mutante o gene *lacZ* sem promotor foi inserido na direção oposta à transcrição do gene *nifN* (Figura 15).

A estirpe mutante GK52 foi incapaz de fixar nitrogênio (Tabela 3). e este fenótipo foi parcialmente revertido pelo plasmídeo (pLGK4.0) contendo o gene *nifN* intacto expresso sob controle do promotor *lac*. Estes dados sugerem que a proteína NifN em *H. seropedicae* é essencial para fixação de nitrogênio e pode estar envolvida na formação de intermediários essenciais para a biossíntese do cofator FeMoco da proteína MoFe.

## 3.5.2. Mutante nifX

Duas estirpes mutantes *nifX* denominados GK10 e GK11 foram obtidas por inserção de um cassete de canamicina no sítio *Sac*I do gene *nifX* (Figura 15).

As atividades de nitrogenase destes mutantes foram semelhantes à da estirpe selvagem (Tabela 3). Portanto, o gene *nifX* em *H. seropedicae* não é essencial para a atividade da nitrogenase nas condições testadas.

Em *K. pneumoniae* a proteína NifX parece possuir um papel regulatório. A superexpressão de NifX inibe a atividade da nitrogenase neste organismo através da diminuição da síntese de mRNA ou por instabilizar os transcritos existentes (GOSINK *et al.*, 1990). Este efeito regulatório da proteína NifX observado em *K. pneumoniae* pode ser devido à interferência que o excesso de NifX pode provocar no processo de formação do cofator FeMoco (SHAH *et al.*, 1999).

Em *A. vinelandii* a proteína NifX também não é essencial para a atividade da nitrogenase *in vivo* (JACOBSON *et al.,* 1989a). Entretanto, é essencial para a biossíntese do cofator FeMoco *in vitro* (SHAH *et al.,* 1999). Foi sugerido que NifX poderia se ligar ao complexo NifNE em algum estágio da biossíntese do cofator e atuar como um suporte molecular para biossíntese de FeMoco ou de seu precursor. Por outro lado NifX não é essencial para ligação de NifB-co ao complexo NifNE (SHAH *et al.,* 1999).

A estirpe mutante *nifX* GK10 de *H. seropedicae* foi testada quanto a sua capacidade de fixação de nitrogênio em meio NFbHP sem adição de ferro. Nestas condições, este mutante apresentou ausência de atividade da nitrogenase quando comparado com a estirpe selvagem (Figura 16).

Em *H. seropedicae*, o gene *nifX* ou outros genes a jusante, que poderiam estar sofrendo um efeito polar da mutação em *nifX*, parecem ser

essenciais para a atividade ou expressão da nitrogenase em condições limitantes de Fe<sup>2+</sup>. A similaridade da proteína NifX de *H. seropedicae* com proteínas envolvidas na biossíntese do FeMoco como NifB de *H. seropedicae* e NifX de *A. vinelandii* (JACOBSON *et al.*, 1989a) sugerem o envolvimento de NifX neste processo de biossíntese. Os resultados de análise fisiológica do mutante *nifX* GK10 sugerem ainda que esse envolvimento pode ocorrer em alguma etapa de incorporação de ferro ou no processo de maturação do cofator. Na estirpe selvagem de *H. seropedicae* a proteína NifX parece ser essencial para auxiliar na incorporação de ferro no FeMoco em condições limitantes deste elemento.

### 3.5.3. Mutante na orf1

A estirpe mutante GK22 de *H. seropedicae* contém uma inserção cassete *lacZ*-Km na *orf1* de *H. seropedicae* (2.17.3) na mesma orientação de transcrição do operon (Figura 15). Este mutante possui atividade da nitrogenase semelhante à estirpe selvagem (Tabela 3). Como o cassete *lacZ*-Km está inserido na mesma orientação de transcrição da *orf1* a expressão deste gene pode ser estudada pela determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase desta estirpe. Atividade de  $\beta$ -galactosidase foi observada somente em condições diazotróficas, ou seja, na ausência de nitrogênio fixado e oxigênio próximo a níveis de 1,5%.

A atividade de  $\beta$ -galactosidase observada na presença de amônia 20 mmol/L ou altas tensões de oxigênio (ar) foi equivalente aos níveis da estirpe selvagem, que não contém o gene *lacZ* (Tabela 2B). Estes resultados sugerem que este gene *orf1* está sendo expresso a partir de um promotor regulado por amônio e oxigênio, provavelmente o mesmo do gene *nifH*. As atividades de nitrogenase (Figura 16) e  $\beta$ -galactosidase (Figura 17) foram determinadas na estirpe mutante GK22 em condições de fixação de nitrogênio em meio sem adição de ferro. A estirpe *H. seropedicae* SMR1 contendo o plasmídeo pIMA217 que carrega uma fusão *nifHD::lacZ* foi utilizada como controle para atividade de  $\beta$ -galactosidase. O mutante GK22 não apresentou atividade de nitrogenase em meio sem adição de ferro, enquanto que a estirpe selvagem apresenta atividade nestas condições (Figura 16). Os resultados indicam que a *orf1* de *H. seropedicae* é essencial para a atividade da nitrogenase em condições limitantes de Fe<sup>+2</sup>.

Baixos níveis de ferro por outro lado, não afetaram a expressão do gene *nifH* na estirpe selvagem ou na estirpe GK22, indicando que o efeito da mutação na *orf1* é sobre a atividade da nitrogenase e não sobre a expressão.

Este efeito é idêntico ao da mutação de *nifX*, portanto não se pode descartar o efeito da mutação em *nifX* pode ser proveniente da polaridade da mutação sobre *orf1* e/ou *orf2* ou sobre outros genes adjacentes ainda não identificados.



Figura 15. Mapa físico e genético dos genes nifHDKENXorf1or2 em H. seropedicae. A posição e orientação de transcrição dos genes são indicadas pelas setas. A região sequenciada neste trabalho está representada em negro. Na parte inferior, estão indicadas as inserções com transposon (Tn5-B20), cassete de *lacZ*-Km e Km e suas respectivas orientações. Sítios de restrição: S, SalI; E, *Eco*RI; Sc, SacI; N, NsiI; B, BamHI.

	Bactéria Genótipo (estirpe) (plasmídeo)			Atividade de β-galactosidase (Unidades Miller)				
			-N/-O2	-N/+O2	+N/-O <sub>2</sub>	+N/+O <sub>2</sub>		
	<i>H. seropedicae</i> (SMR1)	selvagem	17±2	15±2	22±4	25±4		
А	H. seropedicae (SMR1)	(pPGK1.2)	28±3	27±5	30±5	25±4		
	E. coli (YCM10)	(pMC71A)	28±6	20±4	20±6	15±3		
В	H. seropedicae (SMR1)	selvagem	20±3	22±4	25±5	18±2		
	H. seropedicae (GK22)	orf1::lacZ-Km	400±20	28±5	20±5	17±3		
	<i>H. seropedicae</i> (SMR1)	selvagem	25±2	20±4	25±7	26±7		
С	<i>H. seropedicae</i> (SMR1)	(pMGK1.0)	30±7	28±6	19±5	15±3		
	H. seropedicae (GK60)	<i>modA</i> ::Km (pMGK1.0)	33±8	30±9	25±6	15±7		

# Tabela 2. Atividade de $\beta$ -galactosidase em estirpes de *H. seropedicae* e *E. coli*

A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada como descrito em A, 2.19.1, B, 2.17.3 e C, 2.19.2 respectivamente.

-N, isento de nitrogênio, ou +N, em presença de amônia (20 mmol/L); -  $O_2$  (1,5%) ou +  $O_2$  (ar).

Os valores apresentados são a média de pelo menos três experimentos independentes feitos em triplicata. As setas indicam a direção de transcrição do gene.



Figura 16. Efeito da concentração de Fe<sup>2+</sup> sobre a atividade da nitrogenase das estirpes mutantes GK10 e GK22. A atividade da nitrogenase foi determinada em meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado e, ausência de ferro (-), presença de ferro 20 mg/mL (+). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes feitos em triplicata e o coeficiente de variação foi inferior a 10%.

Estirpe (plasmídeo)	Genótipo	Atividade da Nitrogenase (nmol etileno. min <sup>-1</sup> . mg proteína <sup>-1</sup> )
SMR1	estirpe selvagem	8,4 ± 0,9
GK52	<i>nif</i> N::Tn <i>5</i> -B20	0
GK52 (pLGK4.0)	<i>nifI</i> V::Tn <i>5-</i> B20	3,8 ± 0,8
GK10	nifX::Km	7,5 ± 0,7
GK11	nifX::Km	7,2 ± 0,8
GK22	orf1::lacZ-Km	8,0 ± 1,0

# Tabela 3. Atividade da Nitrogenase das estirpes mutantesnifN, nifX e orf1 de H. seropedicae

A atividade da nitrogenase foi determinada em meio NFbHP semi-sólido. Os valores apresentados são a média de três experimentos independentes feitos em triplicata. As setas indicam a direção de transcrição do gene.



Figura 17. Efeito da concentração de Fe<sup>2+</sup> sobre a expressão dos genes nifHD::lacZ e orf1::lacZKm de H. seropedicae. A atividade β-galactosidase foi determinada em culturas crescidas em meio semi-sólido, isento de nitrogênio fixado e (-) ausência de ferro, e (+) presença de 20 mg/mL de ferro. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes feitos em triplicata e o coeficiente de variação foi inferior a 10%.

## 3.6. SEQUENCIAMENTO DOS GENES nifQmodABCfixXC

O plasmídeo pTGK3.7 que contém o fragmento *Eco*RI-*Sal*I de 3,7 kb de *H. seropedicae* foi submetido a deleções sequenciais e os subclones foram sequenciados pelo menos duas vezes nas duas orientações.

O alinhamento foi feito utilizando o programa Auto Assembler (Perkin Elmer), resultando em uma sequência de 3752 nucleotídeos (Figura 18).

A análise da sequência de nucleotídeos revelou a presença de 6 possíveis regiões codificadoras de proteínas (ORF) (Figura 19A e 19B).

A comparação da sequência de nucleotídeos com o banco de dados GeneBank mostrou que o plasmídeo pTGK3.7 contém a região 3' do gene *nifQ* e os genes *modABCfixXC* (Figura 18). Os genes *nifQmodABC* possuem a mesma orientação de transcrição do operon *nifHDKENXorf1orf2* enquanto que os genes *fixXC* são transcritos em direção oposta.

# 3.6.1. Gene *nifQ*

A primeira ORF identificada no plasmídeo pTGK3.7 apresentou similaridade com a região-3' do gene *nifQ* de *A. vinelandii* (55% identidade e 73% de similaridade) (JACOBSON *et al.*, 1989) e *R. capsulatus* (43% identidade, 61% similaridade) (MORENO-VIVIAN *et al.*, 1989b).

50

100

150

200

250

300

350

400

450

500 550

600

650

700

800

# nifQ (região 3') AATTCTTCGGATCACCTGCTGGCCATGCCGAAGGCATTGCCGTGCCCACG : ACCGACCCAGGCGAAGTCCCCGGCTGGCCCCACGCCGTCGCCACCGCCTG : CATGGGCTCCAAGCATCTGTGGCAAGGACATGGGCTTGCCCAACCGCACC : GCCCTGTCCCGGCTGATCAGCCACTACTTTTCCGTCCTGGCCGAGCGGCA : BamHI ACGTCAGCGACGGATCCTGAAGAAGTTCTTCTTATCGGCAATTGTTGCGA : ACGCCGAAGGGCTGGTGCTGTGCCAAGGCCCCCAGCTGCCGGCAATTGTT : TCCGGATTACCTCAAGTGCTTCCGGTCCCGGAAAAGACGGCAATCCATTG : GCTCCGGGCTTACAACTGCCGCTGGGCGCTGTGAACCGTCCTTCATTTCG : modA CCATCTCGTTTTTCCAAGGGAACAAAGTCCATGTTGCGCCACCCTGATGC : TGGCCTGTACCTGGCTGTGGCTGCTGATGCCCGTGGTCCATGCCGAAGGC : TCCCCACGTGCCGTGGCGGCCAATTTCACCCAGCCGTTCAAGCAGATCGC : CCGCCGCGTGCGCCGGCCACCGCTCCCAGGGCGAATGCGGCGTGCCCG : CCCCACCCGGCCAGTTCTACGCCCGCCCACCATTGGCGCCGACTTCGAG : GACCCTGCTTGGCGCCGCATCGCGACCACCCCCTGCCGATCCTGAATGC : CAAGAAGACCCACCGTGTGGCCGCCACCGCCTCCCTGTACGGCCTGTTTG : 750 SacI GGGCGGAGCTCCTGGCCCCGCAGCGCGGGCGCCTCCATGCACCTGTCGCT : 850 GGCCAATCCCAAGCTGGCGCCCTACGGCCTGGCGGGCGTGCAGACCATGC : 900 AGCAGCTGGGCCTGGAAGAGGCCTTGCGGCCCAGATTCGTGCCGGCAGAA : 950 AACGTCAACCAGGCCTACCATTCATCGCCCGCCGCGATGCCCTGCTCCGG : 1000 CTTCGTGGCCTTGTCCCAAGTGGTGTACCGGACCGATCGCCGCCGGCTGG : 1050 PstI GCCTGGCCTCGTGCCGGCCCACCTACATGCGTCCGATCCTGCAGGTCCGC : 1100 AGCCCCGTTGAATACCGCCGTGACCTGCGGCCCCGCTGCGCTGACGACCT : 1150 GCCCCAAGGTACCAAGCGCCCCGCCAGGGCCATCCCTGGGGCACCGGTC : 1200 modB

CACGAGCCCCCGACCCCTAGGGGACCGCCATGTGCGTGTGCCCGGCGGGC		1230
GCCCGGCTGGGCGCGCGGTGCGCCTGCGACTGCAGCCTGCGCCAGCAGAA	:	1300
${\tt CGTCACCGTGCTGCTGCTGTTGTCCGGCTACCCCAGCCGGCCTGGCTGG$	:	1350
TGGAAACCCACGCGCTGCGGGCCGGCGCCATGGCGGGCGG	:	1400
GGCCCCTGCCGCTGGTACTGCCGCCGGGCCGTGCTGGGGTTCTACCTGTT	:	1450
GGTGCTGATGGGCCCCCAGGGCCCCGTGGGGCAGCTGATCCCCGGGATTG	:	1500
${\tt GGGCCGGGCTGGCCGCCCTGCACTCCGTCCTTGGGCGGGAACGTTGGTGC$	:	1550
TGGCCTTCGCTGCTGTACTCCGCCATTGCCCCCCACCGGTGGTGCCAGCC	:	1600
CTTCGGAAGAAAGCGCGGCCAGAGGCCCTGGGCGAAAGGCACCATGGCGA	:	1650
GCAATGCGGCCACCTTTGCCAGAAAACGCCAATCGCCCACCGGGTGGCTT	:	1700
TTTACCGTGGCGACCGTCCCCTTGGCGGGGCCCGGCTTCCTGACGGCAGC	:	1750
GGTACTGGGCTTTGCCCATACCGGGGGCCGAGTTCGGCGTGGTGCTGATGA	:	1800
TCGGCGGCAACATCCCCGGCAAGACCCGGGTCCTTGTCGAAGCAGATCTG	:	1850
TGACCCCGTGGCAAGCCTTCGAATACGCCCAGGCGCACCGCCTGGCGGGC	:	1900
${\tt CGCGATGCTGGTGTTTTCCTTCCTTGTGCTGTTGGTGATGATCCGTCTGG}$	:	1950
GCCGTGCCGGCAAGACCAGGCTCAAGGCAGGCAAGAGTGGCCGCGCACCG	:	2000

modC		
CAGGAAGCGACGGCACAATCCGGCGATGCCAACCAGGAGGACGACGACATGAG	:	2050
GCAAGCCATGGTGGGCCCCAGCATCGCGCAGCCCGGCATCATCGCGAAGA	:	2100
TGGCCTACGGCTACGGCGGCGCGGCGAGTTCCAGCTGGACCTGGAACAC	:	2150
ATCGCCGGCACCGGCGTCAGCGCCTTGAGCGGCCCCTCCGGCTGCGGCAA	:	2200
GACCACCTTCCTGCGCTGCATGGCGGGCCTGCTGCGTCCCAGCCGAGGTT	:	2250
ACCTGGAGGTCAACGGCGAGGTCTGGCGAGAGTTCTCAGCGCCAGTCTTT	:	2300
TTTCCGACCCATCGGCGCGCGCGGGCTACGTCTTCCAGGAGGCCAGCCT	:	2350
GTTGCCCCATCTGTCGGTGAGCCGCAATCTGGACTACGGCGCGCGTCGCA	:	2400
GCGGCGCCGTGTACCAGCGCCGCGTCACCCCCGAAGACCATCGCCCTGCG	:	2450
ACGCAGTCGCCTGCGTTGCTGCAGTACCATGACCCTCAGGCCCTGTCCGG	:	2500
GGGCGAATGCGCCTGTACTGTCGTAAGCCCCTTCAGGCACCGCGCTGTGG	:	2550
TCATGGACGAACCGATGGCCGCCATGGACAACGACCGCAAGCGCGAAATC	:	2600
TGCCTGACCTGGAACGCCTGCGCGACCAGCTGGCCCATTCCCATCCTGTA	:	2650
CATCAGCCACCATCCCGAGGAAATCGCGCGTCTGGCCGACACCCTGGTCT	:	2700
TGATGCGGCAGGGCCGCTGCCTGGCCAGTGGCCCTCTGACCACGCTGCTG	:	2750
TCGCGGCTGGACCTGCCCCTGGCCCAAGCCGAGGATGCCGGGGGGGG	:	2800
CGAGGCCAAGGTCGCCGCCAAGGACGAGACCTCCTCCCCCGACCCCCCG	:	2850
GCCGGAACTCCAAGCCCGTGGCGAGAACCTCGTGCCGCGCCGGCAAGTGC	:	2900
CGGTCGGTCAGCTCGGTGCGGCTGCAGATCCATGCGCGCGACGTCAGCCT	:	2950
GGCCTTGAGCCCCAGCCATGACAGCAGCATCCTGAACCGGCTGTCGGCCA	:	3000
CCGTGCTGAAACTGGCGCCAGCGCAGCATCCAACCCATGTCTGGCCGTGC	:	3050
TGGATGCCCGCGGCGACCACCGCGGGCGCGCATCACGCGGCGTTCCTGCG	::	3100
ATCAACCCGCGCGGGCGGGCGGGCCCACCCGGTACGGCCACCGGTCCAGCC	:	3150
GTGGCCCCTGTTACCGGCATGACGCGGCCGCT <mark>TGA</mark> TTCTTGATCGCACGG	:	3200
GAAGTCGCAGCCGACACTGGCGATGCGGCCATTCGCCATGACGGACCCTC	:	3250
${\tt AGCCGAAGCTTGCACCTACAGTGATGCGCCA{\tt TTA}GACTCGCGCGACGTGG$	:	3300
ATATTCCCAGGCCACGTTGCGATGTTCCGGTGCAGATCACGCGGCAAGTC	:	3350
GGTTCCTCATTCCAGGACGAGCCATCGGTGGTCAGCAGGATCTGACGCCG	:	3400
CCTGCTGTTCGGCCGGTATAGCGAGATCTTCGTGCCGCGCACGGGAAGTG	:	3450
${\tt CAGGTCAGTTGCTGGTCTTGCATTGATCGGCGCATACCGACTGGTTCTGT$	:	3500
GATGGCGATGTGCGGACGGCCGCTGTCGATCTTGTAGCGGTTCTGGAACA	:	3550
fixX		
GCATCTCCCTGCGCAAATCGGACCCCGTCGAATAGCCTCGATACTC		3600
TAGGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC	:	3650
CAACCTCCCCCCATCTCCTTCCTTCCATCACCCCCCCCC	:	3700
CCTGCAGGCATGCAAGCTTTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCTTGCCA		3750
fixC (região 3')		0,00
<b>4</b>		
AA : 3752		

Figura 18. Sequência de nucleotídeos dos genes nifQ (região 3') modABCfixXC de H. seropedicae. O início de cada gene (ATG) está destacado em azul. Os sítios de ligação para ribossomo estão sublinhados. Os códons de terminação (TGA/TAG) são mostrados em vermelho. Os sítios de restrição relevantes são mostrados em verde. As setas indicam a direção de transcrição.



Figura 19A. Identificação das prováveis regiões codificadoras de proteínas dos genes nifQmodABC de H. seropedicae. A sequência de nucleotídeos obtida foi analisada pelo programa Analyseq (Staden, 1983) utilizando a tabela de preferência de uso de códons de H. seropedicae. Cada seção do gráfico representa uma fase de leitura. Os códons de terminação estão representados por um traço vermelho no centro de cada seção. O primeiro aminoácido (metionina) de cada ORF está representado pela letra M na parte inferior de cada seção.



Figura 19B. Identificação de prováveis regiões codificadoras de proteínas dos genes fixCX de H. seropedicae. A sequência de nucleotídeos obtida foi analisada pelo programa Analyseq (Staden, 1983) utilizando a tabela de preferência de uso de códons de H. seropedicae. Cada seção do gráfico representa uma fase de leitura. Os códons de terminação estão representados por um traço vermelho no centro de cada seção. O primeiro aminoácido (metionina) de cada ORF está estão representado pela letra M na parte inferior de cada seção.

## 3.6.2. Gene modA

A 46 pb a jusante do gene *nifQ* foi localizada a segunda ORF e que apresenta similaridade com o produto do gene *modA* de *R. capsulatus* (48% identidade, 56% de similaridade) (WANG *et al.*, 1993). Acima do códon de iniciação (ATG) do gene *modA* foi identificado um provável sítio de ligação de ribossoma (AAGGGAA).

A sequência de aminoácidos da proteína ModA de *H. seropedicae* foi comparada com a de proteínas similares de *R. capsulatus, A. vinelandii,* e *E. coli,* (Figura 20) e sugere que esta ORF pode estar envolvida com transporte de molibdênio em *H. seropedicae.* 

A proteína ModA de E. coli possui uma sequência sinal de exportação para o espaço periplásmico (RECH et al., 1996). As sequências sinais possuem três regiões características, um segmento N-terminal (n) composto de resíduos carregados positivamente, uma região central (h) hidrofóbica e uma região C-terminal (c) polar onde se localiza o sítio de clivagem (HEIJNE, 1983, 1985; HEIJNE e ABRAHMSEN, 1989). Há grande variação no tamanho das sequências sinais em eucariotos e procariotos, mas análises em diversas sequências sugerem um tamanho mínimo para atividade funcional dessas sequências (HEIJNE, 1985). O tamanho da sequência total pode variar de 13 a 23 resíduos, com razoável conteúdo de resíduos de alanina. A região n contém resíduos carregados positivamente, a região h é rica em resíduos de Phe, Ile, Leu, Met, Val e Trp e não deve possuir mais de 20 resíduos hidrofóbicos. A região c pode possuir de 5 a 6 resíduos e contém os resíduos do sítio de clivagem. A análise do padrão de resíduos de aminoácidos próximos ao sítio de clivagem em diversas proteínas periplásmicas revelou que a posição -1 é preferencialmente ocupada por um resíduo de Ala que se repete na posição -3 e são tolerados resíduos carregados na posição -2. Resíduos de Pro são ausentes na região +1 -3. São característicos os resíduos carregados a partir da posição +1 (HEIJNE, 1983).

O sequenciamento da proteína ModA em *E. coli* revelou a perda de 24 resíduos e a sequência N-terminal resultante após o processamento é DEGKITV (RECH *et al.*, 1996). Em *E. coli* a região do sítio de clivagem ALA\*DE (\*significa o local de clivagem) corresponde ao padrão esperado, possuindo um resíduo Ala na posição –1 e –3 com relação ao sítio de clivagem (Figura 20). Observa-se ainda a presença de resíduos hidrofóbicos na região c, resíduos carregados como Asn, Glu e Lys na região +1 e resíduos carregados positivamente Arg e Lys na região n. Em *H. seropedicae* observamos na região próxima ao possível sítio de clivagem os resíduos ADA\*RGP (Figura 20). Nesta região são característicos os resíduos de Ala, bem como o resíduo carregado Arg e o resíduo Pro. Na região h estão presentes resíduos hidrofóbicos como Leu e Val e a região n possui os resíduos carregados positivamente Arg e His. A comparação com dados de sequência de proteínas periplásmicas, e também com a proteína ModA de *E. coli* revelaram que a proteína ModA de *H. seropedicae* possui uma provável sequência sinal.

A proteína ModA de *E. coli* é composta de dois domínios separados pela região de ligação ao ânion molibdato. Os domínios são denominados N e C e o íon molibdato é mantido na interface destes dois domínios. Sete pontes de hidrogênio são formadas entre os resíduos de serina 12, serina 39, alanina 125, valina 152 e tirosina 170 (Figura 20) onde os grupos NH destes resíduos estão envolvidos na ligação com o molibdato. São utilizados também os grupos OH dos resíduos de Ser e Tyr para formar pontes de hidrogênio com os átomos de oxigênio dos íons MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ou ainda WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Os resíduos correspondentes a Ser-12 e Tyr-170 são substituídos por Asn e Ala respectivamente, nas proteínas ModA de *A. vinelandii* (LUQUE *et al.*, 1994) e

*R. capsulatus* (WANG *et al.*, 1993), indicando que a interação da ligação com o molibdato não é conservada entre as proteínas ModA (HU *et al.*, 1997).

Em *H. seropedicae,* o resíduo de Ser-12 foi substituído por uma Asn, a Ser-39 por uma Pro, a Ala-125 por uma Tyr e a Tyr-170 por Ala. Foram, portanto, observadas modificações nos resíduos de aminoácidos envolvidos no possível sítio de ligação de íons molibdato em *H. seropedicae.* Estas alterações sugerem que a ligação de íons molibdato pela proteína ModA de *H. seropedicae* envolve interações diferentes daquelas de *E. coli*.

1	HSModA	MLRHPDAGLHLAVAADAR-GPCRRLPTAVAANFTOPFKOIARR	42
2	RCModA	MTOFPOTLRAGATALALVMGLALPAAAGEVIAAVAANFTEPAKEIGAL	48
3	ECModA	MARKHENT FACE AT SEAVACHAT - DECKTTVEA AT S T.TNAMOD TATO	47
4	AVModA	THE ATTOFT ADMET DUCT A LED TO THE ATTOFT OF THE AREVER	47
-	AvHOUA		** /
э	Consenso	M TLEAGA LL AVAG AL-A GKL AVAANFT PAK IA	
1	HSModA	VRAGHRSQGECGVPAPEGQFYARPTIGADFEDPAWRRIATTPLLFLNA	90
2	RCModA	FTE-KTGHTVTYAFGPSGQFYTQITQGAPFEVFLSADASRPKK	90
3	ECModA	FKK-EKGVDVVSSFASSTLARQIEAGAPADLFISADQKWMDY	89
4	AVModA	YKAAWDAIDTMNNLAPEPLVVRVAGGROGGGTOLTDYGRRIVAMYRALEI	97
5	Consenso	FKA- C DV FADSCOFVROI-TOCAPERBETSAD I.	
5	comsenso	INA O DV INA OQUINGI IQUALLE ILLINAD D	
	11034-13		1 20
T	HSMODA	KKTHRVAATASLIGLEAASLVLWQRQAGKGGKAGRSSWPRSAGASMHL	138
2	RCModA	AVEEGYAVPGSDFTYAVGKLVLWSADPARVDDKGAVLKTDLEHV	134
3	ECModA	AVDKKAIDTATROTLLONSLVVVAPKASVQKDFTIDSKTNWTSLLNGGRL	139
4	AVModA	EYQSALDRLSERINEVTGGDIQAFQRLMHSMSMKTSARNQFAGIVTGLRV	147
5	Consenso	AV A TASR TL GSLVLW A R D G SSKT AG G HV	
1	HSModA	STANPKLAPYGLAGVOTMOOLGLEEALRPREVPAELVNOAYHSSPAAMPC	188
2	RCModA	ATADDKSADYCAAATEUMOKTCVVETTEDKT.VTCKTTSOAVEFAATCNAD	184
2	ECModA	ALADERUTART VALUE ALADERT OF ADART ADART OF AT A THEOLEAD	100
2	ECMODA	AVGDPERVPAGI IAREALQALGAMDILSPALAPAELVRGALALVERNEAP	107
4	AVMODA	GGVDYEVKIPLDAENEIAAVITKASAENLELAIGKEVEALVKSSSVMLTT	191
5	Consenso	A ADPK APYG AA E MQKLG ETL PKLVPGK V QAY SS AP	
1	HSModA	SGFVALSQVVYRTDRRRLGLASCRPTYMRPILQVRSPVEYRRDLRPRCAD	238
2	RCModA	VGFVAY SQVIGKEGGS SWMVPQDLYKP IKQDAVLLKTGAEDAAAKAYL	232
3	ECModA	IGTVYCSDAVASKGVKVVATEPEDSHKKVEYPVAVVRCHNNATVKAFY	237
4	AVModA	FDSIMT. TAPNOL MERUTD THE COUNNEUTLAT. DSCR SVTCUUTAD SCKAT.	247
5	Conconco	CENTROLINGE C A D V I V VIV DA VAAT	241
5	consenso	GEVALSOVV G A P I L V VIG DA RAAL	
		_	
-			
1	HSModA	DLPQGTKRARQGHPWGTGPRAPDPZ 263	
2	RCModA	DFLKTPEALEIIRKYGYVTE 252	
2	ECModA	DYLKGPOAAEIFKRYGFTIK 257	
4	AVModA	GLAPGVAACAFFKSSSVILAVYG 270	
5	Consenso	DLLKGP AAEIFK YG	

Figura 20. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas ModA de H. seropedicae (HSModA), R. capsulatus (RCModA), E. coli (ECModA) e A. vinelandii (AVModA). O alinhamento foi realizado utilizando o programa Antheprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade; em azul, até 75% de similaridade; em verde, acima de 50% e; em cinza, com menos de 50%. Os quadros negros mostram resíduos de aminoácidos que na proteína ModA de E. coli estão envolvidos com a ligação de íons molibdato. Os quadros azuis mostram as posições –1 –3 no sítio de clivagem da proteína ModA de E. coli e o provável sítio em H. seropedicae.

## 3.6.3. Gene modB

A nove pb a jusante do gene *modA* encontra-se a terceira *orf* desta região e apresenta similaridade com o produto do gene *modB* de *R. capsulatus* (43% identidade, 51% similaridade) (WANG *et al.*, 1993) e *A. vinelandii* (37% identidade, 46% similaridade), (LUQUE *et al.*, 1993). Um possível sítio para ligação de ribossoma (AGGGGA) encontra-se sobreposto ao códon de parada do gene *modA*.

A sequência de aminoácidos da proteína ModB de *H. seropedicae* foi comparada com proteínas similares de *R. capsulatus, A. vinelandii* e *E. coli* (Figura 21).

A proteína ModB de *E. coli* possui seis domínios hidrofóbicos estruturalmente semelhantes aos domínios encontrados em proteínas de membros da família de transportadores ABC (HIGGINS *et al.*, 1990). A Figura 22 mostra a localização destas regiões hidrofóbicas nas sequências de aminoácidos das proteínas ModB de *H. seropedicae, E. coli*, *R. capsulatus* e *A. vinelandii.* 

A natureza hidrofóbica de ModB, sua similaridade com membros da família de transportadores ABC e sua localização a jusante ao gene *modA* sugerem que a proteína ModB em *H. seropedicae* forma um canal pelo qual os íons molibdato atravessam a membrana.

1 2 3 4 5	HSModB RCModB ECModB AVModB Consenso	-MCVCPAGARLGARCAC MTEGILFDAAMLTTI MILTDPEWQAV MSFSLSRLVVALGAGLI L A AI	DCSLRQQNV ALTLKLAIV LLSLKVSSL ACAAQAAEV ALSLK A V	I TVLLLASGYP TTVLLLAIGT AVLFSLPFGI QVAVAANFTA TVLLLL FG	SRPGWLETH PLAWWLSRG FFAWLLVRC PMKDIASQF P AWWLSR	ALRAG GGLWK SFPGK EKDTG K	49 48 44 50
1 2 3 4 5	HSModB RCModB ECModB AVModB Consenso	AMAGGRSRGPCRWYCRI EIVATLVSLPIVLPE ALLDSVLHLPLVLPE HKVITSIFG-PTGGFYSQ AVT LPVLPE	AVLGFYLLV TVLGFYLLI VVVGYLLLV IQNGAPFEV VLGFYLLV	IMGPQGPVGQ AMGPNS SMGRRGFIGE FLAADDTTPE MGP G GE	LIPGIG PLTDL RLYDW KLEKEGGTV L D	AGLAA LGFKL FGITF AGSRF AG F	96 88 88 99
1 2 3 4 5	HSModB RCModB ECModB AVModB Consenso	I LHSVIGRERWCWPSLLY SFTFAG AFSWRG TYAVGKLVLWSAKPGYV FSV G	I SALAPHRWC LVVGSVIYS AVLAAAVMS DDQGAVLKK V GAV S	 QPFGRKRGQR LPFVVNPIRN FPLMVRAIRL NAFKHLSIAN PF V IRN	 PWAKGTMAS AFVAMGP ALEGVDV PKTAP-YGA A AMG	I NAATF RPMEV KLEQA AAVQV A QV	146 125 125 148
1 2 3 4 5	HSModB RCModB ECModB AVModB Consenso	 ARKRQSPTGWRFTV AATLRASPLDAFFT ARTLGAGRWRVFFT LAKLGLTEATKSKLVEG AATL A FFT	A TVPLAGPG VALPOAAPG ITLPLTLPG ASIAQAHQF ATLPQA PG	I FLTA-AVLGF LITG-AILGF IIVG-TVLAF VATGNAELGF ITG-AVLGF	AHTGAEFGV AHTVGEFGV ARSLGEFGA VALSQVYKD AHT GEFGV	 VIMIG TITFV GKLTG VLMIG	192 171 171 198
1 2 3 4 5	HSModB RCModB ECModB AVModB Consenso	 GNIPGETRVLVEAD GGIPGETKVLSVTI SNIPGETRTIPSAM GSGWNVPGDLYEPIRQD GNIPG TRVL AD	I FDYVE <b>T</b> LEW MTLIQ <b>T</b> PGG AVILT <b>K</b> GKD T	I DK-AHVLAGG ESGAARLCII NPAA -AL-	I MLAMSFVVI SIALAMISL QALVDYLKG A	I LAMML LISEW PKATE L	208 217 218 242
1 2 3 4 5	ModBHS ModBRC ModBEC ModBAV Consenso	I IERRYGTGARR LARISRERAGR VIKAYGYGLQ- R YG GA			208 228 229 252		

Figura 21. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas ModB de H. seropedicae (HSModB), R. capsulatus (RCModB), E. coli (ECModB) e A. vinelandii (AVModB). O alinhamento foi realizado utilizando o programa Antheprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade; em azul, até 75% de similaridade; em verde, acima de 50% e; em cinza, com menos de 50%. Resíduos de aminoácidos envolvidos com a formação de hélices transmembrana em H. seropedicae estão dentro dos guadros.



Figura 22. Hélices transmembrana das proteínas ModB de H. seropedicae, E. coli, R. capsulatus e A. vinelandii. As sequências de aminoácidos das proteínas ModB foram analisadas quanto à presença de hélices transmembrana, utilizando o programa Anteprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Os quadros vermelhos representam hélices transmembrana. Hs H. seropedicae, Ec E. coli, Rc R. capsulatus, Av A. vinelandii.

#### 3.6.4. Gene *modC*

A quarta ORF identificada no plasmídeo pTGK3.7 apresentou similaridade com o produto do gene *modC* de *R. capsulatus* (41% de identidade, 53% de similaridade) (WANG *et al.*, 1993), de *A. vinelandii* (42% de identidade, 47% de similaridade (LUQUE *et al.*, 1993) e de *E. coli* (29% de identidade, 47% de similaridade) (MAUPIN-FURLOW *et al.*,1995). Foi localizado um possível sítio de ligação para ribossoma AGGAAG (Figura 23).

A proteína ModC de H. seropedicae apresenta os motivos (sequências conservadas de aminoácidos) característicos de proteínas pertencentes à família de transportadores ABC (Figura 23). Estes motivos estão diretamente envolvidos na ligação e hidrólise de ATP, embora não se saiba exatamente como estão envolvidos no processo de transdução de energia (HYDE et al., 1990). Quatro motivos conservados foram identificados através da análise do alinhamento de 94 proteínas transportadoras ABC de E. coli. Três desses motivos são bem caracterizados e têm sido definidos como domínios ABC. Dois deles são os motivos A e B de Walker, que estão diretamente envolvidos com a ligação e hidrólise de ATP (WALKER et al., 1982). O motivo A é uma sequência GXXGXGKST e o motivo B uma sequência XXXXDEP, onde X são aminoácidos hidrofóbicos. O terceiro motivo, denominado de identificação ABC contém os resíduos LSGGE, parece estar envolvido no processo de transdução de energia (HYDE et al., 1990). O quarto motivo contém um resíduo de histidina localizada a aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos do motivo B de Walker, normalmente precedida por quatro resíduos hidrofóbicos e seguida por um resíduo carregado (HYDE et al., 1990).

As proteínas ModA, ModB e ModC de *H. seropedicae* apresentam similaridade e motivos conservados de proteínas do sistema de transporte ABC e estão provavelmente envolvidas no transporte de molibdênio.

1	HSModC	MRQAMVGPSIAQPGIIAKMAYGYGGAGEFQLDLEHIAGTGVS	42
2	AVModC	MNTSFEPGTKGETGALSGGLPADGIRARFRVDYAGFALDVDLTLPGHGVT	50
3	ECModC	MLEINFSOTLGNHCLTINETLPANGIT	27
4	RCModC	MISARFSGROGDFTLDAAFDVPGOGVT	27
5	Consenso		
		Motivo A	
1	HSModC	ALSGPSGCGKTTFLRCMAGLLRPSRGYLEVNGEVWREFSAPVFFPTHRRA	92
2	AVModC	ALFGHSGSGKTTLLRCVAGLERAAEARLEINGELWODSAAGVFLPTHRRA	100
3	ECModC	AIFGVSGAGKTSLINAISGLTRPOKGRIVLNGRVLNDAEKGICLTPEKRR	77
4	RCModC	ALEGPSGCGKTTVLRCMAGLTRLPGGHLVVNGVTWOEGROTTPPHRRA	75
5	Consenso	ALFGPSGCGKTTLLRCMAGLTRP GRLEVNGEVWOD AGVFLPTHRRA	
-			
1	HSModC	LGYVFOEASLLPHLSVSRNLDYGARRSGAVYORRVTPEDHRPATOSPALL	142
2	AVModC	LGYVFORASLEPHLSVRRNLEYGMKRVOAASROVSWERVLELLGTGHL	148
3	FCModC	VCVUFODART.FDHVKURCNT.FVCMSKSMUDOFDKT.VALLCTERT.	121
4	RCModC	VOIVEOEA CLETHI, SUPENI, VCL. PD AP ODL PI SEAEVTOLICIDDI.	122
5	Conconco	I CYUTOPA CI EDUI CUDDNI VCMDD-A - CDU CED U AIICI DI	122
5	consenso	identificação NPC Notivo P	
		Identificação Abc Motivo B	
1	HEMODE	OVUDDONT SCORA CUTURE DE UDAUNADEDKA AMOUDERDE TOT THE	190
1	NIN(adC	UT HDPOPLISGERACTVVSPFRIKAVVHDEPMAAHDADKKKEICLIW	109
2	AVMODE	LERLPGFLSGGERQRVGIARALITSPRILLADEPLAALDLARKNEILPIL	171
3	ECMODE	LURLPGELSGGENQKVAIGRALLTAPELLLLLDEPLASLD LPRKRELLPIL	171
4	RCMOOC	LERPTAILSGGERQRVAIGRALLSQPELLINDEPLSALDELSRDEILPYL	1/2
5	Consenso	L RLPGLISGGERORVAIGRALLT PRLLINDEPLAALD RKREILPYL	
		residuo de His	
	1001-10		000
T	HSMODC	NACATSWPIPILYISHHPEEIARLADTLVLMRQGRCLASGPLTTLLSR-L	238
2	AVModC	ERLHDELD IPMLEVSHIPDEVARLADHVVLLDQGRVTAQGSLQD1MAR-L	247
3	ECModC	QRLTREIN IPMLYVSHSLDEILHLADRVMVLENGQVKAFGALEEVWGSSV	221
4	RCModC	ERLHASLOMPVILVSHILSEVERLADTLVLMEAGRVRAAGPIAAMOAD-P	221
5	Consenso	ERLH EL IPMLYVSH PDEVARLADTVVLLEQGRV A GPL AR-L	
1	HSModC	DLPLAQAEDAGAVIEAKVAAKDETSSPDPPGRNSKPVARTSCRAGKCRSV	288
2	AVModC	DLPTAFHEDAGVVIESVVAEHDDHYHLTRLAFPGGAVLVARRPEAPG	294
3	ECModC	MNPWLPKEQQSSILKVTVLEHHSALRDDRLALGDQHLWVNKLDEP	266
4	RCModC	NLPLIHRPDLAAVIEGVVIALDPAYGLSTLQVPGGRIVVPGNLGPIG	268
5	Consenso	DLPLA EDAGAVIE VVAEHD AY LDRLA PGG V V EP G	
1	HSModC	SSVRLQIHARDVSLALSPSHDSSILNRLSATVLKLAPAQHPTHVWPCWMP	338
2	AVModC	QRLRLRVHARDVSLANSR IEDSSITNVLPATVREVVEADTPAHVLVR	341
3	ECModC	LQLRYYPHSGFRCFSWFYNR	286
4	RCModC	ARRELRVPATDVSLGRHAPTDTTIINALPAVILGAEAAEGYQITVRLALG	318
5	Consenso	RLRLRVHARDVSLA S DSSILN LPATVL A	
1	HSModC	AATTAGAHHAAFLRSTRAGGGPTRYGHRSSRGPCYRHDAAAZ	380
2	AVModC	LEAEGTPLIARITRRSCDOLGIAPGRRMWAQIKAVALLG	380
3	ECModC	RSKPAFVTIAGKSC	300
4	RCModC	ASGEGASLLARVSRKSFDLLGFOPGEOVVARLKAMALSAPAOTGG	363
5	Consenso	A EG PL ART RKSCD LG PG AR KA AL A	

Figura 23. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas ModC de H. seropedicae (HSModC), R. capsulatus (RCModC), E. coli (ECModC), e A. vinelandii (AVModC). O alinhamento foi realizado utilizando o programa Antheprot v 4.3 (DELEAGE, 1999). Em vermelho, são mostrados resíduos de aminoácidos com 100% de identidade; em azul, até 75% de similaridade; em verde, acima de 50% e; em cinza, com menos de 50%.Os quadros mostram os motivos A e B, o domínio de identificação ABC envolvido com o processo de transdução de energia e o domínio contendo um resíduo de His conservada.

## 3.6.5. Genes fixXC

Transcrevendo em direção oposta a dos genes *nifQmodABC*, foram identificadas uma ORF similar ao produto do gene *fixX* de *A. vinelandii* (47% de identidade e 61% de similaridade), (GenBank nº P53658), e a região C-terminal de outra ORF similar ao gene *fixC* de *Rhizobium* sp (38% de identidade e 68% de similaridade) (EARL *et al.*, 1987).

# 3.7. ANÁLISE DA REGIÃO INTERGÊNICA nifQ-modA

A região intergênica *nifQ-modA* que conteria o possível promotor *modA* foi subclonada no vetor de fusão *lacZ* pMP220 produzindo o plasmídeo pMGK1.0 que foi transformado nas estirpes SMR1 e GK60 (*modA::*Km) de *H. seropedicae.* Os transconjugantes foram cultivados 4 vezes em meio sem molibdênio antes da determinação de atividade de  $\beta$ -galactosidase. O cultivo dos inóculos em meio sem molibdênio foi feito com a finalidade de exaurir molibdênio acumulado.

Os transconjugantes não apresentaram atividade de βgalactosidase em nenhuma das condições testadas (Tabela 2C), sugerindo que não existe promotor na região intergênica *nifQ-modA* de *H. seropedicae*.

Em *E. coli, K. pneumoniae* e *R. capsulatus* o molibdênio inibe a expressão dos genes *modABC* (RECH *et al.*, 1995; IMPERIAL *et al.*, 1995;KUTSCHE *et al.*, 1996).

A expressão do operon *modABCD* em *E. coli* não é detectável na estirpe selvagem, mesmo quando crescida em meio sem molibdênio (RECH *et al.*, 1995; ROSENTEL *et al.*, 1995). Altos níveis de transcrição foram observados somente em estirpes mutantes *modA*, *modB*, *modC* e a

desrepressão pode ser revertida pela adição de molibdato no meio. O molibdato aparentemente pode ser transportado por sistemas alternativos de baixa afinidade e sua entrada leva a repressão do operon *modABCD* (MILLER *et al.*, 1987; RECH *et al.*, 1995; ROSENTEL *et al.*, 1995).

Mutações no gene *modE* de *E. coli* desreprimem a transcrição de *modABCD*, mesmo em presença de molibdato, sugerindo que a proteína ModE é repressora desse operon (GRUNDEN, *et al.*, 1996; McNICHOLAS *et al.*, 1996). Em *E. coli*, a proteína ModE é expressa constitutivamente e, em presença de molibdato, se liga ao DNA, impedindo a transcrição dos genes *modABCD*. A ligação ao DNA é feita pelo reconhecimento da região –10, que contém a sequência GTTATATTG e dois pentâmeros TAYAT (Y= C ou T) (GRUNDEN *et al.*, 1996). A ligação de ModE à região promotora do operon *modABCD* em *E. coli* foi confirmada por McNICHOLAS *et al.* (1997), que identificaram uma região de 28 pb (-18+10) protegida por ModE. Em, *A. vinelandii* e *H. influenzae*, a sequência CGTTATATA N<sub>4-12</sub> TATATAACG também está presente (KUTSCHE *et al.*, 1996).

Em *R. capsulatus* não foi identificado o gene *modE* e no lugar do produto deste gene as proteínas MopA e MopB interagem formando um heterodímero que se liga à região promotora do operon *mopAmodABCD* (KUTSCHE *et al.*, 1996; MASEPHOL e KLIPP, 1996). Uma sequência TATAT característica de região de ligação da proteína ModE em *E. coli* foi identificada na região promotora do operon *mopAmodABCD* em *R. capsulatus* e, provavelmente, é o local onde as proteínas MopAMopB se ligam (KUTSCHE *et al.*, 1996).

A análise da sequência de nucleotídeos da região intergênica nifQmodA de H. seropedicae não revelou a presença de nenhuma região semelhante a sequência de ligação de ModE/MopA. Portanto os dados de sequenciamento e a ausência de atividade de promotor na região intergênica *nifQ-modA* de *H. seropedicae* sugerem que os genes *nifQmodABC* são transcritos a partir de sequência promotora provavelmente situada a montante do gene *nifQ*.

# 3.8. MUTAGÊNESE DOS GENES nifQ E modA de H. seropedicae

## 3.8.1. Mutante modA

Uma estirpe mutante *modA* de *H. seropedicae* foi obtida pela inserção de um cassete de Km no sítio *SacI* (Figura 24). Esta estirpe mutante denominada GK60 foi selecionada por sua resistência a canamicina e deficiência de crescimento em meio contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. A estirpe GK60 apresenta deficiência na atividade da nitrogenase em meio isento de molibdênio (Figura 25).

A estirpe *modA*<sup>-</sup> de *H. seropedicae* possui atividade da nitrogenase semelhante a estirpe selvagem somente quando a concentração de molibdato adicionado no meio foi superior a 10 µmoles/L, enquanto a estirpe selvagem apresenta atividade mesmo quando molibdato não foi adicionado ao meio (Figura 26). Portanto, a estirpe mutante *modA* de *H. seropedicae* apresenta atividade de nitrogenase comparável a selvagem na presença de pelo menos 10<sup>4</sup> vezes mais molibdênio, revelando que o produto do gene ModA faz parte de um sistema de transporte de alta afinidade para íons molibdato em *H. seropedicae*, como observado em outros microrganismos, tais como *E. coli* (CORCUERA *et al.*, 1993), *K. pneumoniae* (IMPERIAL *et al.*, 1984), *C. pasteurianum* (ELLIOT e MORTENSON, 1975) *R. capsulatus* (WANG *et al.*, 1993) e *B. japonicum* (MAIER e GRAHAM, 1988). Os resultados também sugerem a existência de um sistema de transporte de transporte de molibdênio alternativo em *H. seropedicae,* pois, em altas concentrações, o molibdênio foi incorporado pela estirpe *modA*<sup>-</sup>.

Um plasmídeo contendo uma fusão *nifHD::lacZ* de *H. seropedicae* (MACHADO *et al.*, 1999) foi introduzido na estirpe mutante *modA* de *H. seropedicae* GK60 que foi capaz de expressar a atividade de  $\beta$ -galactosidase igual à estirpe selvagem contendo a fusão nas mesmas condições, indiferente da presença de molibdênio no meio (Figura 27). Portanto, a ausência de atividade da nitrogenase na estirpe mutante *modA*<sup>-</sup> não foi devido à ausência de expressão dos genes da nitrogenase. Provavelmente a diminuição da atividade nessa estirpe mutante foi devido à deficiência no transporte de molibdênio.

A capacidade de crescimento em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio e a produção de nitrito foram testadas na estirpe mutante *modA*<sup>-</sup> de *H. seropedicae* (Figura 28 e 29 respectivamente). Os resultados mostraram que a deficiência no sistema de alta afinidade para o transporte de molibdato interfere também na atividade da molibdoenzima nitrato redutase em *H. seropedicae* de forma semelhante a estirpe *modA*<sup>-</sup> de *E. coli* (RECH *et al.*, 1996).

## 3.8.2. Mutante nifQ

Uma estirpe mutante *nifQ de H. seropedicae* foi obtida pela inserção no sítio *Bam*HI de um cassete lacZ*Km* (Figura 24). Esta estirpe denominada GK55 não apresentou atividade da nitrogenase em meio isento de molibdênio. Este efeito foi revertido pela adição de altas concentrações de molibdênio. (Figura 25).

Os resultados obtidos com o mutante *nifQ* de *H. seropedicae* sugerem que este gene pode estar envolvido na incorporação de molibdênio na

nitrogenase, como observado em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* (IMPERIAL *et al.*, 1984; JOERGER e BISHOP, 1988).

Esta estirpe também apresentou deficiência de crescimento em meio contendo nitrato e produção de nitrito (Figura 28 e 29) sugerindo que a mutação no gene *nifQ* produziu um efeito polar sobre os genes *mod*, afetando o transporte de molibdênio, que se reflete na baixa atividade da molibdoenzima nitrato redutase.

Portanto, a ausência de sequência promotora, a ausência de atividade de promotor na região intergênica *nifQmodA* e a deficiência de crescimento em nitrato do mutante *nifQ* sugerem que os genes *nifQmodABC* são dependentes da expressão de um mesmo promotor a montante do gene *nifQ*.



Figura 24. Mapa físico e genético dos genes nifQmodABCfixXC em H. seropedicae. A orientação de transcrição dos genes é indicada pelas setas. Na parte inferior estão indicadas as inserções com cassete de lacZKm e Km. Sítios de restrição: S, Sall; E, EcoRI; Sc, SacI; P, PstI; B, BamHI.


Figura 25. Atividade da nitrogenase nas estirpes selvagem SMR1 e mutantes GK60 e GK55 de H. seropedicae. A atividade da nitrogenase foi determinada em meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado, sem adição de molibdato de sódio utilizando meio tratado com carvão ativo (-) ou na presença de molibdato de sódio 9 µmol/L (+). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes feitos em triplicata, e o coeficiente de variação foi inferior a 10%.



Figura 26. Efeito da concentração de molibdato de sódio na atividade da nitrogenase em estirpes SMR1 e GK60 de *H. seropedicae.* Foram utilizadas células crescidas em meio NFbHP2 (tratado com carvão ativo) sem adição de molibdato de sódio, por 16 horas. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP (tratado com carvão ativo) isento de nitrogênio fixado e com diferentes concentrações de molibdato de sódio. Após 4 horas de incubação, foi determinada a atividade da nitrogenase. Os resultados são a média de três experimentos independentes.



Figura 27. Expressão dos genes nifHD::lacZ de H. seropedicae nas estirpes SMR1 e GK60, em condições limitantes de molibdênio. A atividade da βgalactosidase foi determinada em culturas crescidas em meio semi-sólido, isento de nitrogênio fixado e sem adição de molibdato de sódio utilizando meio tratado com carvão ativo (-) e presença de molibdato de sódio 9 µmol/L (+). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes feitos em triplicata. O coeficiente de variação foi inferior a 10%.



Figura 28. Curva de crescimento das estirpes SMR1, GK60 e GK55 de *H.* seropedicae, em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio. As culturas foram crescidas em meio NFbHP, contendo nitrato de sódio 10 mmol/L como fonte de nitrogênio. O crescimento foi acompanhado pela medida da densidade ótica em 550 nm. Os resultados são a média de três experimentos independentes.



Figura 29. Determinação da produção de nitrito pelas estirpes SMR1, GK60, GK55 de H. seropedicae. As culturas foram crescidas em meio NFbHPN20 por 16 horas, centrifugadas e ressuspensas em meio NFbHP contendo nitrato de sódio 10 mmol/L. Foram coletadas alíquotas das culturas e as células foram lisadas com CTAB (brometo de cetilmetilamônio 200 μg/mL) para medir a quantidade de nitrito formado. Os resultados são a média de três experimentos independentes.

## 3.9. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE GENES ENVOLVIDOS COM A FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM DIVERSOS DIAZOTROFOS.

Os genes *nifHDKENXorf1orf2* e *nifQmodABCfixXC* localizam-se em uma única região do genoma de *H. seropedicae* (Figura 30). Os genes *nifAB,* (SOUZA *et al.*, 1990) estão em regiões distintas no genoma de *H. seropedicae*.

Em *K. pneumoniae,* os genes *nif* apresentam-se agrupados em uma única região do genoma, organizados em oito unidades transcricionais (MERRICK, 1993). Em outros diazotrofos como *A. vinelandii* (JACOBSON *et al*, 1989), *R. capsulatus* (MORENO-VIVAN *et al.*, 1989, MERRICK *et al.*, 1993), *B. japonicum* (HENNECKE *et al.*, 1988) e *A. brasilense* (GALIMAND *et al.*, 1989, PASSAGLIA *et al.*, 1991/1995; FRAZZON e SCHRANK, 1998) os genes *nif* encontram-se intercalados por uma variedade de ORFs ou, ainda, espalhados no genoma.

Assim sendo, o fato de os genes *nif* estarem organizados em blocos, mesmo espalhados dentro do genoma, nos diferentes organismos, pode estar relacionado com suas funções específicas e com a regulação de suas expressões.

A presença de um único operon *nifHDKENXorf1orf2* é incomum entre os diazotrofos. Organização similar foi observada somente em *M. maripaludis* (KESSLER *et al.*, 1998) e *A. diazotrophicus* (SEVILLA *et al.*, 1998), nos quais os genes *nifENX* encontram-se em um único operon, junto com os genes estruturais da nitrogenase, sob controle de promotor a montante ao gene *nifH*. Em *B. japonicum* (AGUILAR *et al.*, 1989) os genes *nifDKENX* também compõe um único operon sob controle do promotor do gene *nifD*.

Muitas ORFs encontradas próximas aos genes nif em diferentes organismos não possuem função definida, mas seus produtos devem colaborar na fixação de nitrogênio. Algumas vezes a função do produto de um gene pode ser indicada pela sua localização. Em R. capsulatus a similaridade da proteína NifX com a proteína NifB e também a localização do gene nifX próximo aos genes nifEN indicaram um possível envolvimento do produto deste gene com a biossíntese do FeMoco (MORENO-VIVIAN et al., 1989a). Esta sugestão vem sendo confirmada por experimentos de biossíntese do FeMoco in vitro com a proteína NifX purificada de A. vinelandii (SHAH et al., 1999). Os mesmos resultados com mutante nifX de H. seropedicae sugerem fortemente o envolvimento de NifX na biossíntese do FeMoco. As orf1 e orf2 adjacentes ao gene nifX podem também estar envolvidas na biossíntese do FeMoco. Esta sugestão é reforçada pelos resultados obtidos com a estirpe mutante na orf1 que não possui atividade da nitrogenase em condições limitantes de ferro. Estes genes podem estar envolvidos em alguma etapa importante na maturação e/ou inserção do FeMoco em H. seropedicae.

A localização do gene *nifQ* em *H. seropedicae* adjacente aos genes *modABC* ainda não havia sido descrita. Isto pode indicar um maior envolvimento da proteína NifQ no metabolismo do molibdênio em *H. seropedicae*. Esta sugestão é suportada por dois motivos: 1) a expressão dos genes *nifQmodABC* dependente de um único promotor a montante do gene *nifQ* relaciona a proteína NifQ ao transporte de molibdênio em *H. seropedicae* e, 2) a proteína NifQ pode estar envolvida na mobilização ou estocagem de molibdênio, afetando a atividade de molibdoenzimas de *H. seropedicae*, como a nitrogenase e a nitrato redutase.



Figura 30. Organização estrutural de genes envolvidos com a fixação de nitrogênio em diversos diazotrofos. Kp, K. pneumoniae; Av, A. vinelandii; Rc, R. capsulatus; Mm, M. maripalidus; Bj, B. japonicum; Ad, A. diazotrophicus; Ab, A. brasilense. Os genes nifHDKENX estão destacados em cores, os demais genes nif/fix/mod estão em branco, ORFs apresentam-se em cinza e as setas indicam direção de transcrição.

## 4. CONCLUSÕES

- Os genes nifENXorf1orf2 e nifQmodABCfixXC foram isolados e sequenciados e estão localizados a jusante dos genes nifHDK em H. seropedicae.
- Os genes *nifHDKENXorf1orf2* constituem um único operon cuja expressão está sob controle do promotor do gene *nifH*.
- O gene nifív é essencial para fixação de nitrogênio em H. seropedicae, possivelmente envolvido na síntese do cofator FeMoco. Mutante neste gene é Nif negativo.
- Os genes *nifX* e *orf1* são essenciais para a atividade da nitrogenase em condições de deficiência de ferro.
- 5) Os genes *nifQ* e *modA* são essenciais para atividade da nitrogenase em condições de deficiência de molibdênio.
- 6) Os genes *nifQ* e *modA* são essenciais para atividade da nitrato redutase.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, M.; TAORMINO, J.; THONY, B.; RAMSEIER, T.; HENNECKE, H.; SZALAY, A. The *nifEN* genes participating in FeMo cofactor biosynthesis and genes encoding dinitrogenase are part of the same operon in *Bradyrhizobium* species. <u>Mol.Gen. Genet.</u>, Berlin, v.224, p.413-420, 1990.
- ALLEN, R.M.; CHATTERJEE, R.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. Incorporation of iron and sulfur from NifB cofactor into the iron0molybdenum cofactor of dinitrogenase. J.Biol.Chem. Baltimore, v. 270, p.26890-26896, 1995.
- ALLEN, R.M.; CHATTERJEE, R.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. The requirement of reductant for in vitro biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. J.Biol. Chem. Baltimore, v.271, p.4256-4260, 1996.
- ALLEN, R.M.; ROLL, J.T.; RANGARAJ, P.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN,
  P.W. Incorporation of molybdenum into the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. <u>J.Biol.Chem.</u> Baltimore, v.274, p.15869-15874, 1999.
- ALLEN, RM.; HOMER, M.J.; CHATTERJEE, R.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P.; SHAH, V.K. Dinitrogenase reductase and mgATP dependent maturation of apodinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. <u>J. Biol.Chem.</u>, Baltimore, v. 268, p.23670-23674, 1993.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.;MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped blast ans psi-Blast: a new generation of protein database search programs. <u>Nucl.Acid.Res.</u>, Oxford, v.25, p. 3389-3402, 1997.

- AMES, G. F. L. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism and evolution. <u>Ann.Rev. Biochem.</u>, v.55, p.397-425, 1986.
- ANGOVE, H.C.; YOO, S.J.; MUNCK, E.; BURGESS, B.K. An all ferrous state of the Fe Protein of nitrogenase. <u>J. Biol.Chem.</u>, Baltimore, v.273, p.26330-26337, 1998.
- ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP,W.; PRIEFER, U.B.; PUHLER, A. Nucleotide sequence of a 24206 base pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. J.Mol. Biol., Londres, v.230, p. 714-738, 1988.
- BACKMAN, K.; CHEN, Y.M.; MAGASANIK, B. Physical and genetic characterization of the *E. coli* chromosome. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, Washington, v. 78, p. 3743-3747, 1981.
- BAIROCH, A.; BUCHER, P.; HOFMANN, K. The prosite database, its status in 1997. <u>Nucl.Acid.Res.</u>, Oxford, v.25, p.217-221, 1997.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. <u>Symbiosis</u>., Rehovot, v.13, p.65-73, 1992.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. <u>An. Acad. Bras. Cien.</u>, Rio de Janeiro, v.56, p.365, 1984.

- 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. <u>Int. J. Syst. Bacteriol.</u>, Washington, v.36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.I.D.;
  OLIVARES, E.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 GroupI) as *Herbaspirillum* species 3. Int. J. Syst. Bacteriol.,
  Washington, v. 46, p. 802-810, 1997.
- BATUT, J.; DAVERAN, M.L.; DAVID, M.; JACOBS, J.; GARNERONE, A.M; KAHN,
  D. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*,
  regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. <u>EMBO J.</u>, Oxford, v.8, p.1279-1286, 1989.
- BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S., RIGO, L.U.; PEDROSA, F.
  Evidence for two possible *glnB* type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. <u>J.</u>
  Bacteriol., Washington, v.179, p.4623-4626, 1997.
- BENEMANN, J. R. VALENTINE, R.C. The Pathways of Nitrogen Fixation. <u>Adv.</u> Microbial. Physiol., Califórnia. v. 8, p. 59-104, 1972.
- BENEMANN, J.R.; SMITH, M.; KOSTEL, P.J.; MCKENNA, C.E. Tungsten incorporation into Azotobacter vinelandii nitrogenase. <u>FEBS Letters</u>, Amsterdan, v.29, p.219-221. 1973.

- BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. The isolated catalytic of NifA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription in vitro: Activation is inhibited by NifL. <u>Proc. Natl. Acad.Sci. USA.</u>, Washington, v.91, p.103-107, 1994.
- BISHOP, P.E.; JARLENSKI, D.M.L.; HETHERINGTON, D.R.. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. <u>Proc.Natl.</u> <u>Acad.Sci USA</u>., Washignton, v.77, n.12, p.7342-7346, 1980.
- BISHOP, P.E.; JARLENSKI, D.M. L.; HETHERINGTON, D.R. Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., Washington., v.1150, p.1244-1251, 1982.
- BISHOP, P.E.; JOERGER, R.D. Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. <u>Annu.Ver.Plant Physiol. Plant Mol.Biol.</u>, v.41, p.109-125, 1990.
- BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R. Alternative nitrogen fixation systems. In:Biological nitrogen fixation. STACEY, G.; BURRIS, R.H. EVANS, H.J.Chapmann e Hall, New York, p.736-762, 1992.
- BOGUSZ, D; HOUMARD, J.; AUBERT, J.P. Electron transport to nitrogenase in *Klebseilla pneumoniae* purification and properties of *nif* J protein. <u>Eur. J.</u> <u>Biochem.</u>, Heidelberg, v.120, p.421-426, 1981.
- BOYER, W.H.; ROULLAND-DUSSOIX, D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli* . <u>J. Mol. Biol.</u>, London, v.41, p.459-472, 1969.

- BRIGLE, K.E. WEISS, M.C.; NEWTON, W.E.; DEAN, D.R. Products of the ironmolybdenum cofactor –specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenumiron protein genes, *nifD* and *nifK*. J. Bacteriol., Washington, v.169, p.1547-1553, 1987.
- BRUIJIN, F.J.; LUPSKI, J.R. The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids- a review. <u>Gene</u>, Amsterdan, v.27, p.131-149. 1984
- BUCHANAN-WOLLASTON, V.; CANNON, M.C.; BEYNON, J.C.; CANNON, F. The role of the *nif*A gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. <u>Nature</u>, London, v.294, p.776-778, 1981.
- BUCK, M. Transcriptional activation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E. eds. Nitrogen fixation:achievements and objectives. New York: Chapman and Hall, p.451-457, 1990.
- BUCK, M.; CANNON, W. Activator-independent formation of a closed complex between  $\sigma^{54}$ -holoenzyme and *nifH* and *nifU* promoters of *Klebsiella pneumoniae*. <u>Mol. Microbiol.</u>, Oxford, v.6, p.1625-1630, 1992.
- BUCK, M.; MILLER, S.; DRUMMOND, M.; DIXON, R. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. <u>Nature</u>, London, v.320, p.374-378, 1986.

- BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of gln B and glnD gene products in regulation of the gln ALG operon of Escherichia coli. <u>J.</u> <u>Bacteriol</u>., Washington, v. 164, n.2, p.816-822, 1985.
- BURNS, R.C.; HARDY, K.W. <u>Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher plants.</u> Berlin:Springer-Verlag, 1975.
- CANNON, M; HILL, S.; KAVANAUGH, E.; CANNON, F. A molecular genetic study of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae* at the level of transcription, translation and nitrogenase activity. <u>Mol.Gen.Genet.</u>, Berlin, v.198, p. 198-206, 1985.
- CHAN, M.K.; KIM, J. ; REES, R.C. The nitrogenase FeMo-cofactor and Pcluster pair : 2.2 A resolution structure. <u>Science</u>, Washington, v.260, p. 792-794, 1993.
- CHAN, J.M.; CHRISTIANSEN, J.; DEAN, D.R.; SEEFELDT, L.C. Spectroscopic evidence for changes in the redox state of the nitrogenase P-cluster during turnover. <u>Biochemistry</u>, Washington, v. 38, p.5779-5785, 1999.
- CHAN, J.M.; RYLE, M.J.; SEEFELD, L.C. Evidence that MgATP accelerates primary electron transfer in a *Clostridum pasteurianum* Fe Protein-*Azotobacter vinelandii* MoFe protein nitrogenase tight complex. <u>J.Biol.</u> Chem., Baltimore, v.274, p.17593-17598, 1999.
- CHAN, J.M.;HUYETT, J.E; SEEFELDT, L.C. Roles for nucleotides in nitrogenase catalysis. In TRIPLETT, E.W. eds. <u>Prokaryotic Nitrogen Fixation A model</u>

system for the analysis of a Biological Process. Madison: Horizon Scientific Press. p.113-130, 2000.

- CHATTERJEE, R.; ALLEN, R.M.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor and maturation of the *nif*-encoded apodinitrogenase. J. Biol.Chem., Baltimore, v. 272, p.21604-21608, 1997.
- CHEN, L.; GAVINI, N.; TSURUTA, H.; ELIEZER, D.; BURGESS, B.K.; DONIACH, S.; HODGSON, K.O. MgATP-induced conformational changes in the iron protein from *Azotobacter vinelandii,* as studied by small-angle X-ray Scattering. J.Biol.Chem., Baltimore, v.269, p.3290-3294, 1994.
- CHRISTIANSEN, J.; GOODWIN, P.J. LANZILOTTA, W.N.; SEEFELDT, L.C.; DEAN, D.R. Catalytic and biophysical properties of a nitrogenase Apo-MoFe protein produced by a *nifB*-deletion mutant of *Azotobacter vinelandii*.<u>Biochemistry</u>, Washington, v. 37, p.12611-12623, 1998.
- COLLINS, J.J.; ROBERTS, G.P.; BRILL, W.J. Posttranslational control of *Klebsiella pneumoniae nif* mRNA stability by the *nifL* product. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v. 168, p. 173-178, 1986.
- CORCUERA, G.L.; BASTIDAS, M.; DUBOURDIEU, M. Molybdenum uptake in *Escherichia coli* K12. J.Gen.Microbiol., Reading, v.139, p.1869-1875, 1993.
- CORPET, F. Multiple sequence aligment with hierarchical clustering. <u>Nucl. Acid.</u> Res., Oxford, v.16, p. 10881-10890, 1988.

- DAVID, M.; DAVERAN, M.L.; BATUT, J.; DECLIEN, A.; DOMERGUE, O.; GHAI,
  J.; HERTIG, C.; BOISTARD, P.; KAHN, D. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. <u>Cell</u>, Cambridge, v.54, p.671-683, 1988.
- DAVIS, R. D.; LEHMAN, L.; PETROVICH, R.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P. LUDDEN, P.W. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodopirillum rubrum*. <u>J.</u> <u>Bacteriol.</u>, Washington, v.178, p.1445-1450, 1996.
- DAVIS, R.; LEHMAN, L.; PETROVICH, R.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.;
  LUDDEN, P.W. Purification and Characterization of the Alternative
  Nitrogenase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. <u>J.</u>
  <u>Bacteriol.</u>, Washington, v. 178, p. 1445-1450, 1996.
- DAWES, I.W.; SUTHERLAND, I.W. <u>Microbial Physiology</u>. 2ed. Oxford: Blackwell, 1992. 289p.
- DEAN, R. D.; BOLIN, J.T.; ZHENG, L. Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. <u>J. Bacteriol.</u>, Washington, v. 175, n.21, p.6737, 1993.
- DeBRUIJN, F.J.; AUSUBEL, F.M. Cloning and characterization of the *glnf* (*ntrA*) gene of *Klebsiella pneumoniae* : role in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilation genes. <u>Mol. Gen. Genet.</u>, Berlin, v.192, p.342-353, 1983.

- DEISTUNG, J.; CANNON, F.C.; CANNON, M.C.; HILL, S.; THORNELEY, R.N.F. Electron transfer to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. <u>Biochem. J.</u>, London, v.231, p. 743-753, 1983.
- DELEAGE, G., CLERC, F.F. ROUX, B., GAUTHERON, D.C. Antheprot: a pachage for protein sequence analysis using a microcomputer. Disponível em <u>http://pbil.ibcp.fr/ANTHEPROT</u>.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. <u>Bioch. Biophys Acta</u>, Amsterdan, v.127, p.285-94, 1966.
- DILWORTH, M.J.; ELDRIDGE, M.E.; EADY, R.R. The molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*: effect of elevated temperature on N<sub>2</sub> reduction. <u>Biochem. J.</u>, London, v.289, p.395-400, 1993.
- DILWORTH, M. J.; FISHER, K.; KIM, C.H.; NEWTON, W.E. Effects on substrate reduction of substitution of histidine 195 by glutamine in the α subunit of the MoFe Protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. <u>Biochemistry</u>, Washington, v.37, p.17495-17505, 1998.
- DIXON, R.O.D.; WHEELER, C.T. <u>Nitrogen Fixation in Plants</u>. ed. Glasgow: Blackie, 1986. 157 p.
- DIXON, R.; KENNEDY, C.; KONDOROSI, A.; KRISHNAPILLAI, V.; MERRICK, M. Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. <u>Mol. Gen. Genet.</u>, Berlin, v. 157, p.189-198, 1977.

- DIXON, R.A. The genetic complexity of nitrogen fixation. <u>J. Gen. Microbiol.</u>, Reading, v.130, p.2745-2755, 1984.
- DOBEREINER, J. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R. et al. (eds). <u>New Horizons in Nitrogen</u> <u>Fixation</u>. Netherlands: Kluver Academic Publishers, 1993. p.671-676.
- DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. <u>Symbiosis</u>, Rehovot, v.13, p.1-13, 1992a.
- DOBEREINER, J. Isolation and identification of root associates diazotrophs. <u>Plant. Soil.</u>, Dordrecht, v.110, p-207-212, 1989.
- DOBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions : Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. <u>Cienc. Cult.</u> (São Paulo), v.44, p.310-313, 1992b.
- DOBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A; TRIIPER, H.G.; DWORKIN, M; HARDER, W. (eds). <u>The Prokariotes</u>. Berlin: Springer Ferlag, 1991. p.2236-2253.
- DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. The genus *Azospirillum*. In:\_\_\_\_\_. <u>Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants</u>. Madison: Science Tech. Publishers, 1987, 155p.
- DRETS-MARTÍNEZ, G; FABIANO, E.; CARDONA, A. Carbohydrate catabolism in *Azospirillum amazonense* . <u>App.Environ Microbiol.</u>, Washington, v.50, n.1, p.183-185, 1985.

- DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nif*LA promoter in *Klebsiella pneumoniae*. <u>Nature Londres</u>, v.301, p.302-307, 1983.
- DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae* : homologies to other regulatory proteins. <u>EMBO J.</u>, Oxford, v.5, p.441-447, 1986.
- EADY, R.R. Enzymology in free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W.J. e PUHLER, S. <u>Nitrogen Fixation</u>, Oxford: Clarendon Press., v.4, 1986. p. 1-49.
- EADY, R.R. Regulation of nitrogenase activity. In: GIBSON, A.H.; NEWTON,
  W.G. eds. <u>Current Perspectives in Nitrogen Fixation</u>. Canberra: Australian
  Academy of Science, 1981. p.172-180.
- EADY, R.R. The Mo-, V-, and Fe- Based nitrogenase systems of *Azotobacter*. <u>Adv. in Inorg. Chem.</u>, San Diego, v.36, p.77-102, 1991.
- EADY, R.R.; RICHARDSON, T.H.; MILLER, R. W.; HAWKINS, M. LOWE, D.J. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. <u>Biochem. J</u>., London, v.256, p.189-196, 1988.
- EARL, C.D., RONSON, C.W.; AUSUBEL, F.M..Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti fixA, fixB, fixC* and *fixX* genes. <u>J. Bacteriol.</u>, Washington v.169, p.1127-1136, 1987

- ELLIOT, B.B.; MORTENSON, L.E. Transport of molybdate by *Clostridium pasteurianum*. J.Bacteriol., Washington, v. 124, p.1295-1301, 1975.
- EVANS, D; JONES, R.; WOODLEY, P; ROBSON, R. Further analysis of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Azotobacter chroococcum*: Identification and expression in *Klebsiella pneumoniae* of *nif*S, *nif*V, *nif* M and *nif*B genes and localization of *nif*E/N<sup>-</sup>, *nif*U<sup>-</sup>, *nif* A<sup>-</sup> and *fix* ABC<sup>-</sup> like genes. J. Gen. <u>Microbiol</u>., Reading, v.134, p. 931-942, 1988.
- FALK, E.C.; JOHNSON, J. L., BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J.; KRIEG.
  N.R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. <u>Int. J. Syst. Bacteriol.</u>, Washington.
  v.36, n.1, p.80-85, 1986.
- FLEISCHMANN, R.D.; ADAMS, M.D.; WHITE, O.; CLAYTON, R.A.; KIRKNESS,
  E.F.; KERLAVAGE, A.R.; BULT, C.J.; TOMB, J.F.; DOUGHERTY, B.A.;
  MERRICK, J.M.; MCKENNEY, K.; SUTTON, G.; FITZHUGH, W.; FIELDS, C.A.;
  GOCAYNE, J.D.; SCOTT, J.D.; SHIRLEY, R.; LIU, L.I.; GLODECK, A.;
  KELLEY, J.M.; WEIDMAN, J.F.; PHILLIPS, D.A.; SPRIGGS, T.; HEDBLOM, E.;
  COTTON, M.D.; UTTERBACK, T.R.; HANNA, M.C.; NGUYEN, D.T.; SAUDEK,
  D.M.; BRANDON, R.C.; FINE, L.D.; FRITNHMAN, J.L.; FUHRMAN, J.L.;
  GEOGHAGEN, N.S.M.; GNEHM, C.L.; MCDONALD, L.A.; SMALL, K.V.;
  FRASER, C.M.; SMITH, H.O.; VENTER, J.C. Whole-genome random
  sequencing and assembly of *haemophilus influenzae*. Science, Washington,
  v. 269, p. 496-512, 1995.

- FRAZZON, J.; SCHRANK, I.S. Sequencing and complementation analysis of the nifUSV genes from Azospirillum brasilense. <u>FEMS. Microbiol.Lett</u>., Amsterdan, v. 159, p. 151-158, 1998.
- FREIBERG, C.; FELLAY, R., BAIROCH, A.; BRHOUGTON, W.J.; ROSENTHAL, L, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. <u>Nature</u>. Londres, v.387, p.394-401. 1997
- FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. <u>J. Bacteriol.</u>, Washington, v.171, n.6, p.3168-3175, 1989.
- FU, W.; JACK, J.; MORGAN, T.; DEAN, D.; JOHNSON, M. *nifU* gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. <u>Biochemistry</u>, Washington, v. 33, p. 13455-13463, 1994.
- GALLIMAND, M.; PERROUD, B.; DELOME, F.; PAQUELIN, A.; VIEILLE, C.;
  BOZOUKLIAN, H. Identification, of DNA region homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifS*, and *fixABC* in *Azospirillum brasilense* Sp7. <u>J. Gen.</u>
  <u>Microbiol.</u>, Reading, v.135, p.1047-1059, 1989.
- GAVINI, N.; BURGUESS, B.K. FeMo cofactor synthesis by a *nifH* mutant with altered MgATP reativity. <u>J.Biol.Chem.</u>, Baltimore, v. 267, p.2179-21186, 1992.

- GENNARO, G.; HÜBNER, P.; SANDMEIER, U.; YAKUNIN, A.F.; HALLENBECK, P.C Cloning, characterization, and regulation of *nifF* from *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol., Washington, v.178, p.3949-3952, 1996.
- GEORGIADIS, M.M.; KOMIYAH, H.; CHAKRABARTI, P; WOO, D.; KORNUC, J.J. REES, D.C. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. <u>Science</u>, Washington DC, v.257, p.1653-1659, 1992.
- GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE,
  B.; REINHOLD, B; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between
  [*Pseudomonas*] rubrisubalbicans, some clinical isolates (EFGRUP 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [*Aquaspirillum*] authotrophicum. In:
  POLSINELLI, M.; MATERASSI, R; VINCENZINI, M., ed. <u>Nitrogen</u>
  <u>Fixation</u>. Dordrecht: Kluver Acad. Publish., p 293-294, 1990.
- GLASER, J.H.; DEMOSS, J.A. Phenotypic restoration by molybdate of nitrate reductase activity in *chID* mutants of *Escherichia coli* . <u>J.Bacteriol</u>.
   Washington, v.108. p.854-860, 1971.
- GOLDBERG, I; NADLER, V.; HOCHMAN, A. Mechanism of nitrogenase switch-off by oxygen. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.169, n.2, p.874-879, 1987.
- GOLDMAN, B.S.; LIN, J.T.; STEWART, V. Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate and nitrite-responsive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella aerogenes* M5A1. J.Bacteriol., Washington, v.156, p.5077-5085, 1994.

- GOODWIN, P.J.; AGAR, J.N.; ROLL, J.T.; ROBERTS, G.P.; JOHNSON, M.K.; DEAN, D.R. The *Azotobacter vinelandii* NifEN complex contains two identical [4Fe-4S] clusters. <u>Biochemistry</u>, Washington, v.37, p.10420-10428, 1998.
- GORDON, J.K.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Feedback inhibition of nitrogenase. J. Bacteriol., Washington, v.148, p.884-888, 1981.
- GOSINK, M.M., FRANKLIN, N.M.; ROBERTS, G.P. The product of the *Klebsiella pneumoniae nif* X gene is a negative regulator of the nitrogen fixation (*nif*) regulon. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.172, n.3, p.1441-1447, 1990.
- GOUBLER, M.; HENNEEKE, H. Regulation of the *fixA* gene and *fixBC* operon in *bradyrhizobium japonicum*. <u>J. Bacteriol.</u>, Washington, v. 170, p. 1205-1214, 1988.
- GRUNDEN, A.M.; RAY, R.M.; ROSENTEL, J.K. HEALY, F.G. SHANMUNGAM K.T. Repression of the *Escherichia coli modABCD* opeorn (molybdate transport) by ModE. J. Bacteriol., Washington, v.178, p.735-744, 1996.
- GRUNDEN, A.M.; SHANMUGAM, K.T. Molybdate transport and regulation in bacteria. Arch. Microbiol., New York, v.168, p.345-354, 1997.
- HAAS, D. ; HOLLOWAY. Chromosome mobilization by the plasmid R6845: a tool in *Pseudomonas* genetics. <u>Mol.Gen. Genet.</u>, Berlin v.158, p.229-37, 1978.

- HAGEMAN, R.V. ; BURRIS, R.H. Kinetic studies on electron transfer and interaction between nitrogenase componentes from *Azotobacter vinelandii*.
   <u>J. Am.Chem.Soc.</u>, Washington, v.17, n.20, p.4117-124, 1978.
- HAGEMAN, R.V. ; ORMEJOHNSON, W.H.; BURRIS, R.H. Role of magnesium adenosine 5'-triphosphate in the hydrogen evolution reaction catalized by nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* . <u>Biochemistry</u>., Washington, v.19, p.2333-342, 1980.
- HALLENBECK, P.C.; GENNARO, G. Stopped-flow kinetic studies of low potential electron carriers of the photosynthetic bacterium, *Rhodobacter capsulatus* : ferredoxin I and NifF. <u>Biochem. Biophys.Acta</u>. Amsterdan, v. 1365, p.435-442, 1998.
- HARRIOT, T.; HOSTED, T.J.; BENSON, D.R. Sequences of *nifX,nifW,nifZ, nifB* and two ORF in the *Frankia* nitrogen fixation gene cluster. <u>Gene</u>. Amsterdan, v.161, p.63-67. 1995
- HARTMANN, A.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. <u>J. Bacteriol.</u>, Washington, v.169, n.3, p.944-948, 1987.
- HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v. 165, n.3, p.864-870, 1986.
- HARVEY, I.; ARBER, J.M.; EADY, R.R.; SMITH, B.E.; GARNER, D.; HASNAIN, S.S. Iron K-edge X-ray-absortion spectroscopy of the iron-

vanadium cofactor of the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. <u>Biochem.J.</u>, London, v.266, p.929-931, 1990.

- HAUSINGER, R.P. ; HOWARD, J.B. The amino acid sequence of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. <u>J.Biol.Chem</u>., Baltimore, v.257, n.5, p.2483-90, 1982.
- HAWKES, T.R.; SMITH, B.E. The inactive MoFe protein (*nif* B<sup>-</sup> Kp1) of the nitrogenase from *nif* B mutants of *Klebsiella pneumoniae* . <u>Biochem. J.</u>, London, v.223, p.783-792, 1984.
- HAWKES, T.R.; McLEAN, P.A.; SMITH, B.E. Nitrogenase from *nif* V mutants of *Klebsiella pneumoniae* containsan altered form of the iron-molybdenum cofactor. <u>Biochem. J.</u>, London, v.217, p.317-321, 1984.
- HEIJNE VON, G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. <u>Eur. J. Biochem.</u>, Heidelberg, v.133, p.17-21, 1983.
- HEIJNE VON, G. Signal sequences the limits of variation. <u>J. Mol. Biol.</u>, Londres, v.184, p.99-105, 1985.
- HEIJNE VON, G.; ABRAHMSEN, L. Species-specific variation in signal peptide design implications for protein secretion in foreign hosts. <u>FEBS Letters.</u> Amsterdan, v.244, p.439-446, 1989.
- HEMSCHEMEIER, S.; GRUND, M.; KEUNTJE, B.; EICHENLAUB, R. Isolation of *Escherichia coli* mutants defective in uptake of molybdate. <u>J.Bacteriol</u>., Washington, v.173, p.6499-6506, 1991.

- HENIKOFF, S. Unidirectional digestion with endonuclease-III creates target break points for DNA sequencing. <u>Gene</u>, Cambridge, v.28, p.351-359. 1984.
- HIGGINS, C.F.; GALLAGHER, M.P.; HYDE, S.C.; MIMMACK, M.L.; PEARCE, S.R. Periplasmic binding protein-dependent transport systems: the membraneassociated components. <u>Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.</u>, London, v. 326, p. 353-365, 1990.
- HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M.. Fast and sensitive multiple sequence alingments on a microcomputer. Cabios. v.5, p.151-153. 1989.
- HILL, S.; KAVANAGH, E.P. Roles of *nif* F and *nif* J gene products in electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.141, n.2, p.470-471, 1980.
- HOMER, M.J.; DEAN, D.R.; ROBERTS, G.P. Characterization of the γ protein and its involvemente in the metallocluster assembly and maturation of dinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. J.Biol.Chem., Baltimore, v.270, p.24745-24752, 1995.
- HOMER, M.J.; PAUSTIAN, T.D.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P. The *nifY* product of *Klebsiella pneumoniae* is associated with apodinitrogenase and dissociates upon activation with the iron-molybdenum cofactor. <u>J.Bacteriol.</u>, Washignton, v. 175, p.4907-4910, 1993.

- HOOVER, T.R.; IMPERIAL, J.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. Homocitrate is a component of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. <u>Biochemistry</u>, Washington, v.28, p.2768-2771, 1989.
- HOOVER, T.R.; IMPERIAL, J.; LIANG, J.; LUDDEN, P.W. SHAH, V.K. Dinitrogenase with altered substrate specificity results from use of homocitrate analogues for *in vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor. <u>Biochemistry</u>, Washington, v.27, p. 3647-3652, 1988.
- HOWARD, K.S.; McLEAN, P.A.; HANSEN, F.B.; LEMLEY, P.V.; KOBLAN,
  K.S.; ORME-JOHNSON, W.H. Kp *nif*M gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase ironprotein in *Escherichia coli*. <u>J.</u>
  <u>Biol. Chem.</u>, Baltimore, v.261, n.2, p.772-778, 1986.
- HOWARD, J.B.; DAVIS, R; MOLDENHAUER, B; CASH, V.L. ; DEAN, D. Fe:S cluster ligands are the only cysteines required for nitrogenase Fe-protein activities. J.Biol.Chem., Baltimore, v.264, n.19, 1989.
- HU, Y.; RECH, S.; GUNSALUS, R.P.; REES, D.C. Crystal structure of the molybdate binding proteina ModA. <u>Nature Struc.Biol.</u>, London, v.4, p. 703-707, 1997.
- HUNT, T.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF, glnG* and *glnL.* <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>., Washington, DC, v. 82, p. 8453-8457, 1985.
- HYDE, S.C.; EMSLEY, P.; HARTSHORN, M.J.; MIMMARCK, M.M.; GILEADI, U.; PEARCE, S.R.; GALLGHER, M.P.; GILL, D.R.; HUBBARD, R.E.; HIGGINS,

C.F. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. <u>Nature</u>, London, v.346, p. 362-365, 1990.

- IMPERIAL, J.; UGALDE, R.A.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Role of *nif* Q gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.158, n.1, p.187-194, 1984.
- IMPERIAL, J.; UGALDE, R.A.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Mol-mutants of *Klebsiella pneumoniae* requiring high levels of molybdate for nitrogenase activity. J.Bacteriol., Washington, v.163, p.1285-1287, 1985.
- IMPERIAL, J.; HADI, M.; AMY, N.K. Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli mod* molybdate transport system. <u>Biochem.Biophys. Acta</u>, Amsterdan, v.1370, p.337-346, 1998.
- IONNIDIS, I.; BUCK, M. Nucleotide sequence of the *Klebsiella pneumoniae* nif D gene and predicted amino acid sequence of the subunit of nitrogenase MoFe protein. <u>Biochem. J.</u>, London, v.247, p.287-291, 1987.
- JACOBITZ, S.; BISHOP, P.E. Regulation of nitrogenase-2 in Azotobacter vinelandii by ammonium, molybdenum and vanadium. <u>J.Bacteriol</u>., Washinton, v.174, p.3884-3888. 1992.
- JACOBSON, M.R.; CASH, V.L.; WEISS, M.C.; LAIRD, N.F.; NEWTON, W.E. DEAN, D.R. Biochemical and genetic analysis of the *nif* USVWZM

cluster from *Azotobacter vinelandii*. <u>Mol. Gen. Genet.</u>, Berlin, v.219, p.49-57, 1989b.

- JACOBSON, M.R.; BRIGLE ,K.E.; BENNETT, R.A.; SETTERQUIST, M.S.W.; Valerie, C.; Beynon,J.; Newton, W.E.; Dean. R.D. Physical and Genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii* . <u>J. Bacteriol</u>., Washington, v.171, p.1017-1027, 1989a.
- JANG, S.B.; SEEFELDT, L.C. PETERS, J.W. Modulating the midpoint potential of the [4Fe-4S] cluster of the nitrogenase Fe protein. <u>Biochemistry</u>, Washington, v. 39, p. 641-648, 2000.
- JOERGER, R.D.; BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *nifB-nifQ* region from *Azotobacter vinelandii* . <u>J. Bacteriol</u>., Washington, v.170, p.1475-1487. 1988.
- JOUANNEAU, Y.; MEYER, C.M.; VIGNAIS, P.M. Regulation of nitrogenase activity through iron protein interconversion into an active and an inactive form in *Rhodopseudomonas capsulata*. <u>Biochem. Biophys. Acta</u>., Amsterdan, v.749, p.318-328, 1983.
- KAMINSKI, P.A.; MANDON, K.; ARIGONI, F.; DESNOUES, N.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: identification of *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. <u>Mol. Microbiol</u>., Oxford, v.5, p.1983-1991., 1991.
- KAMINSKI, P.A.; NOREL, F.; DESNOUES, N.; KUSH, A.; SALZANO, G.; ELMERICH, C. Characterization of the *fixABC* region of *Azorhizobium*

*caulinodans* ORS571 and identification of a new nitrogen fixation gene. <u>Mol.</u> <u>Gen. Genet.</u>, Berlin, v. 214, p. 496-502, 1988.

- KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase actuvutues of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria : roles of the conserved amino-terminal domain of NtrC. <u>Proc. Natl. Acad.</u> <u>Sci. USA.</u>, Washington, v.85, p.4976-4980, 1988.
- KELLY, M.J.S.; POOLE, R.K.; YATES, M.G.; KENNEDY, C. Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome *bd* terminal oxidase compex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome *d* complex are unable to fix nitrogen in air. J. Bacteriol, Washington, v. 172, p. 6010-6019, 1990.
- KENNEDY, C.; DEAN, D. The *nifU*, *nifS*, and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. <u>Mol.Gene.Genet.</u> Berlin, v.231, p.494-498, 1992.
- KESSLER, P.S.; BLANK, C.; LEIGH, J.A. The *nif* gene operon of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. <u>J. Bacteriol</u>., Washington, v.180, p.1504-1511, 1998.
- KIM, J. ; REES, D.C. Crystallographic strcture and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. <u>Nature</u>., London, v.360, p.553-560, 1992.
- KIM, J. ; REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. <u>Biochemistry</u>., Washington, v.33, n.2, p.389-97, 1994.

- KIM, J. ; WOO, D.; REES, D.C. Xray cristal structure of the nitrogenase molybdenum-iron proteina from *Clostridium pasteurianum* at 3.0 -A resolution. <u>Biochemistry</u>., Washington, v.32, n. 28, p.7104-7115, 1993.
- KLASSEN, G., PEDROSA. F.O., SOUZA, E.M. FUNAYAMA, S., RIGO, L.U.. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. <u>Can. J. Microbiol</u>. Ottawa, v.43, p.841-846, 1997.
- KOKOTEK, W.; LOTZ, W. Cosntruction of a *lacZ*-kanamycin resistance cassette, useful for site-direct mutagenesis and as a promoter probe. <u>Gene</u>, Cambridge, v. 84, p.467-471, 1989.
- KONG, Q.; WU, Q.; MA, Z.; SHEN, S. Oxygen sensitivity of the *nif* LA promoter of *Klebsiella pneumoniae*. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.166, n2, p.353-356, 1986.
- KUST, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEIS, D. Expression of  $\sigma^{54}$  (*ntr*A)-dependent genes is probably united by a common mechanism. <u>Microbiol. Rev.</u>, Washington, v.53, p.367-376, 1989.
- KUTSCHE M.; LEIMKUHLER,S.; ANGERMULLER, S.; KLIPP,W. Promoters controlling expression of the alternative nitrogenase and the molybdenum uptake system in *Rhodobacter capsulatus* are activated by NtrC, independent of  $\sigma^{54}$ , and repressed by molybdenum. <u>J. Bacteriol.</u>, Washington, v.178, p.2010-2017, 1996

- KYRITSIS, P. ; HUBER, G.; QUINKAL, I.; GAILLARD, J.; MOULIS, J.M. Intramolecular electron transfer between [4Fe-4S] clusters studied by proton magnetic resonance spectroscopy. <u>Biochemistry</u>, Washington, v. 36, p.7839-7846, 1997.
- LANZILOTTA, W.N.; FISHER, K.; SEEFELD, L.C. Evidence for electron transferdependent formation of a nitrogenase iron protein-molybdenum-iron protein tight complex. <u>J. Biol. Chem.</u>, Baltimore, v.272, p.4157-4165, 1997.
- LANZILOTTA, W.N.; FISHER, K.; SEEFELD, L.C. Evidende for electron transfer from the nitrogenase iron protein to the molybdenum-iron protein without MgATP hydrolisis: characterization of a tight protein-protein complex. <u>Biochemistry</u>, Washigton, v.35, p.7188-7196, 1996.
- LEE, H. S., BERGER, D.K.; KUSTU, S. Activity of purified NifA, a transcriptional activator of nitogen fixation genes. <u>Proc. Nat. Acad. Sci.</u> v.90, p. 2266-2270, 1993.
- LEE, S.H.; PULAKAT, L.; PARKER, K.C.; GAVINI, N. Genetic analysis on the NifW by utilizing the yeast two-hybrid system revealed that the NifW of *Azotobacter vinelandii* iteracts with NifZ to form higher-order complexes. <u>Biohem.Biophys.Res.Commun</u>., Orlando, v.244, p.498-504, 1998.
- LEHMAN, L.J.; ROBERTS, G.P. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. <u>J. Bacteriol</u>. Washington, v.173:5705-5711, 1991.

- LEI, S.; PULAKAT, L.; GAVINI, N. Regulated Expression of the *nifM* of *Azotobacter vinelandii* in Response to Molybdenum and Vanadium Supplements in Burk's Nitrogen-Free Growth Medium. <u>Biochem. Biophys.</u> <u>Res. Commun.</u>, Orlando, v. 264, p. 186-190, 1999.
- LINTON, K.J.; HIGGINS, C. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. <u>Mol. Microbiol.</u>, Oxford, v.28, p.5-13, 1998.
- LOU, J.; MOSHIRI, F.; JOHNSON, M.K.; LAFFERTY, M.E.; SORKIN, D.L.; MILLER, A.F.; MAIER, R.J. Mutagenesis studies of the FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* : roles of histidine and lysine residues in the protection of nitrogenase from oxygen damage. <u>Biochemistry</u>, Washington, v. 38, p.5563-5571, 1999.
- LOWE, D.J.; POSTGATE, J.R.; THORNELEY, R.N.F. Biochemical constrain on biological nitrogen fixation. In: MALIK, A.M.; NAQVI, S.H.M.; ALEEN, M.I.H. <u>Nitrogen and The Enviroment.</u> Faisalabad: Nuclear Inst. Agric. Biol, p.73-91,1985.
- LOWRY, O.M.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, AL.L; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. <u>J. Biol.Chem.</u>, Baltimore, v.193, p.267-275, 1951.
- LUQUE, F.; MITCHENALL, L.A.; CHAPMAN, M.; CHRISTINE, R.; PAU, R.N. Characterization of genes involved in molybdenum transport in *Azotobacter vinelandii*. <u>Mol. Microbiol</u>, Oxford, v. 7, p. 447-459. 1992.

- MACALUSO, A.; BEST, E.A., BENDER, R.A. Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated opeorns of *Klebsiella aerogenes*. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.172, p.7249-7255, 1990.
- MACHADO, H.B.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; STREFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3-like-ntrBntrC* operon and are negatively regulated. <u>Can. J. Microbiol.</u>, Ottawa, v. 41, p.674-684, 1995.
- MACHADO, I.M.P. Organização dos genes estruturais da nitrogenase em Herbaspirillum seropedicae . Curitiba, 1999. 206p. Tese (Doutorado Ciências-Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M. PEDROSA, F.O.
  Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. <u>Braz. J.Med.Biol.Res</u>. Ribeirão Preto, v.29, p. 1599-1602, 1996
- MACHEROUX, P.; HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; KIM, S.O.; POOLE, R.; DIXON, R. Electron donation to the flavoprotein NifL, a redoxsensing transcriptional regulator. <u>Biochem.J.</u>, London, v.332, p.413-419, 1998.
- MAGALHÃES, L.M.; NEYRA, C.A.; DOBEREINER, J. Nitrate and nitrite reductase negative mutants of N<sub>2</sub> fixing *Azospirillum* spp. <u>Arch. Microbiol.</u>, Heidelberg, v.117, p.247-252, 1978.

- MAGASANIK, B. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. <u>Trends</u> <u>Biochem. Sci.</u>, Cambridge v.13, p.475-479, 1988.
- MAIER, R.J.; GRAHAM, L. Molybdate transport by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. J.Bacteriol., Washington, v.170, p.5613-5619, 1988.
- MAIER, R.J.; GRAHAM, L.; KEEFE, R.G.; PIHL, T.; SMITH, E. *Bradyrhizobium japonicum* mutants defective in nitrogen fixation and molybdenum metabolism. <u>J. Bacteriol</u>., Washington, v.169, p.2548-2554, 1987.
- MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the altenative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. <u>Arch. Microbiol</u>., New York, v. 165, p. 80-90, 1996.
- MAUPIN-FURLOW, J.A.; ROSENTHEL, J.K.; LEE, J.H.; DEPENNMEIR, U.; GUNSALUS, R.P.; SHANMUGAM, K.T..Genetic analysis of the *modABCD* (molibdate transport) operon of Escherichia coli. <u>J. Bacteriol</u>., Washington, v.177, p.4851-4856. 1995.
- MAYER, S.M.; LAWSON, D.M.; GORMAL, C.A.; ROE, S.M.; SMITH, B.E. New insights into structure-function relationships in nitrogenase: A 1.6A resolution X-ray crysltalographic study of *Klebsiella pneumoniae* MoFeprotein. J.Mol.Biol., Londond, v. 343, p. 345-356. 1999.
- McNICHOLAS, P.M.; CHIANG, R. capsulatus.; GUNSALUS, R.P. The *Escherichia coli modE* gene: effect of *modE* mutation on molybdate dependent *modA* expression. <u>FEMS Microbiol. Let.</u>, Amsterdan, v.145, p.117-123, 1996.
- MCNICHOLAS, P.M.; RECH, S.A.; GUNSALUS, R.P. Characterization of the ModE DNA-binding sites in the control regions of *modABCD* and *moaABCDE* of *Escherichia coli*. <u>Mol. Microbiol.</u>, Oxford, v.23, p. 515-524, 1997.
- MENSINK, R.E.; HAAKER, H. Temperature effects on the MgATP induced electron transfer between the nitrogenase protein from *Azotobacter vinelandii* . <u>Eur.J.Biochem.</u>, Heidelberg, v.208, p.295-99, 1992.
- MERRICK, M.; HILL, S. HENNECKE,; HAHN, M. DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nif*L gene product in *Klebsiella pneumoniae*. <u>Mol.Gen.Genet.</u>, Berlin, v.185, p.75-81, 1982.
- MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes . In:
   PALACIOS, R.; MARA, J.; NEWTON, W.E. (eds) <u>New Horizons in Nitrogen</u>
   <u>Fixation.</u> Netherlands: Nijhoff Publishers, 1992. p.1-12.
- MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E. <u>Nitrogen Fixation : Hundred Years After.</u> Proc. 7th. Cong. on N=Nitrogen Fixation. Koln (Cologne), 1988. New York, Fischer, 1988. p.293-302.
- MERRICK, M.J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae* : involvment of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA* <u>EMBO J.</u>, Oxford, v.2.p 39-44, 1983.

- MILLER, J.B.; SCOTT, D.J.; AMY, N.K. Molybdenum-sensitive transcriptional regulation of the *chlD* locus of *Escherichia coli*. <u>J. Bacteriol</u>. Washington, v.169, p.1853-1860, 1987.
- MILLER, J.H. A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. New York:Cold Spring Harbour Laboratory Press, 456 p., 1992.
- MORENO-VIVIAN, C.; HENECKE, S.; PUHLER, A; KLIPP, W..Open reading frame 5 (ORF5), encoding a ferredoxin like protein, and *nifQ* are cotranscribed with *nifE*, *nifN*, *nifX* and ORF4 in *Rhodobacter capsulatus*. <u>J. Bacteriol</u>., Washington, v.171, p. 2591-2598. 1989b.
- MORENO-VIVIAN, C.; SCHMEHL M.; MASEPHOL, L,B.; ARNOLD,W.; KLIPP,W.. DNA sequence and genetic analysis of the *Rhodobacter capsulatus nifENX* gene region: Homology between NifX and NifB suggests involvement of NifX in processing of the iron-molybdenum cofactor. <u>Mol.Gen. Genet.</u>, Berlin, v.216, p.353-363, 1989a.
- MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a proteina binding sit. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</u>, Washington, v.85, p.9401-9405, 1988.
- MORGAN, T.V.; McCRACKEN, J.; ORME-JOHNSON, W.H.; MIMS, W.B.; MORTENSON, L.E.; PEISACH, J. Pulsed electron paramagnetic resonance studies of the interaction of Mg-ATP and D<sub>2</sub>O with the iron protein of nitrogenase. <u>Biochemistry</u>, Washington, v.29, p.3077-3082, 1990.

- MORNINGSTAR, J.E.; HALES, B.J. Electron paramagnetic resonance study of the vanadium-iron protein of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* . <u>J</u> <u>Am. Chem. Soc.</u>, Washington, v.109, p.6854-6855, 1987.
- MORTENSON, L.E.; THORNELEY, R.N.F. Structure and function of nitrogenase. <u>Annu.Rev. Biochem.</u>, Palo Seto, v.48, p. 387-418, 1979.
- MOUNCEY, N.J.; MITCHENALL, L.A; PAU, R. Mutational analysis of genes of the *mod* locus involved in Molybdenum transport, homeostasis, and processing in *Azotobacter vinelandii* . J. Bacteriol., Washington, v.177, p.5294-5302, 1995.
- MOUNCEY, N.J.; MITCHENALL, L.A; PAU, R. The *modE* gene product mediates molybdenum-dependent expression of genes for the high-affinity molybdate transporter and *modG* in *Azotobacter vinelandii*. <u>Microbiology</u>., v.142, p.1997-2004, 1996.
- NEWTON, W.E. eds. <u>Nitrogen Fixation Research Progress</u>. Drodrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.522.
- NEYRA, C.A.; VAN BERKUN, P. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. <u>Can. J. Microbiol</u>., Ottawa v.23, p.306-310, 1977.
- NYBORG, A.C.; ERICKSON, A.; JOHNSON, J.L.; WATT, G.D. Reductantdependent ATP utilizaiton during nitrogenase catalysis studies using TI(III).
  In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. <u>Nitrogen</u> <u>Fixaiton: From molecules to Crop Productivity</u>. Proc. 12<sup>th</sup> Int. Cong. on Nitrogen Fixation, 2000. Foz do Iguaçú, Brasil.

- OW, D.W.; AUSUBEL, F.M. Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. <u>Nature</u>, London., v. 301, p.307-317, 1983.
- PASSAGLIA, L.M.P.; NUNES, C.P.; ZAHA, A.; SCHARANK, I.S. The *nifHDK* operon in free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises genes *H,D,K* an 353-bp ORF and gene *Y*. <u>Braz.J.Med.Biol.Res.</u>, Ribeirão Preto, v.24, p.649-675, 1991.
- PASSAGLIA, L.M.P.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I.S. The two overlapping Azospirillum brasilense upstream activator seuences have differential effects on *nifH* promoter activity. <u>Can. J. Microbiol.</u>, Ottawa, v. 41, p.849-854, 1995.
- PAU, R.N.; MITCHENALL, L.A.; ROBSON, R.L. Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. <u>J.Bacteriol</u>., Washington, v.171, n.1, p.124-129, 1989.
- PAUL, W.; MERRICK, M. The roles of *nif*W, *nif* Z and *nif* M genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. <u>Eur. J. Biochem.</u>, Heidelberg, v.178, p.675-682, 1989.
- PAUSTIAN, T.D.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P. Purification and characterization of *nifN* and *nifE* gene products from *Azotobacter vinelandii* <u>Proc.Natl. Acad. Sci. USA</u>, Washington , v.86, p.6082-6086, 1989.

PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S. Regulation of *nif* genes expression in *Azospirillum brasilense* and Herbaspirillum seropedicae. In: SKINNER, F.A. BODDEY, R.M.; FENDRIK, I. (eds). <u>Nitrogen Fixation with non-legumes</u>. Dordrecht: Kluver Academic Publishers, 1989. p.155-163.

- PEDROSA, F.O.; STEPHAN, M.; DOBEREINER, J.; YATES, M.G. Hydrogenuptake hidrogenase activity in nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. <u>J.</u> <u>Gen. Microbiol.</u>, Reading, v.128, p.161-166, 1982.
- PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of Azospirillum brasilense by nif A and ntr (gln) type gene products. <u>FEMS</u> Microbiol. Lett., Amsterdan, v.23, p.95-101, 1984.
- PEDROSA, F.O. Fixação Biológica de nitrogênio: fértil idéia. <u>Ciencia Hoje</u>, São Paulo, v.6, p.12-13, 1987.
- PEDROSA, F.O., TEIXEIRA, K. R.S., MACHADO I.M.P., STEFFENS, M.B.R., KLASSEN, G., BENELLI, E. M., 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*. <u>Soil Biol.Biochem.</u> v.29, p.843-846, 1997.
- PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. *nif* mutants of *Azospirillum brasilense*: evidence for a *nif* a-type regulation. In: KLINGMULLER, W. ed. <u>Azospirillum II</u>: Genetics, Physiology, Ecology. Basel: Birkhauser-Verlag, 1983. p.66-77.
- PEREIRA, J.A.R., CAVALCANTE, V.A.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with Azospirillum spp and Herbaspirillum

seropedicae. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, (eds). <u>Nitrogen Fixation with non-legumes</u>. Doedrecht: Kluver Academic Publishers, 1989. p. 219-224.

- PERSUHN, D.C.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. Functional analysis of the Ntr system of *Herbaspirillum seropedicae*. <u>FEMS Microbiol. Let.</u>, Amsterdan, submetido, 2000.
- PETERS, J.W.; STOWELL, h.b.; SOLTIS, S.M.; FINNEGAN, M.G.; JOHNSON,
  M.K.; REES, D.C. Redox-dependent structural changes in the nitrogenase
  P-cluster. <u>Biochemistry</u>, Washington, v.36, p. 1181-1187, 1997.
- PIENKOS, P.T.; BRILL, W. Molybdenum accumulation and storage in *Klebsiella* pneumoniae and Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol., Amsterdan, v.145, p.743-751, 1981.
- PIERRARD, J.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: existence of two independent regulatory effcts of ammonium. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.175, n.5, p.1358-1366, 1993.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. <u>Plant.</u> <u>Soil.</u>, Dordrecht, v. 137, p.61-65, 1991.
- PORTER, S.C.; NORTH, A.K. KUSTU, S. Mechanism of transcriptional activation by NtrC. In: J.a. Hoch and T.J. Silhavy (ed), Two component signal

transduction. American Spciety for Microbiology, Washington, DC. p.147-158, 1995.

POSTGATE, J. Nitrogenase. Biologist., London, v.32, n.1, p.43-8, 1985.

- POSTGATE, J.R. Prospects for the exploitation of biological nitrogen fixation. <u>Phil. Trans. R. Soc. Lond.</u>, Brighton, v.290, p.143-7, 1980.
- POSTGATE, J.R. Biological nitrogen fixation: Fundamental. <u>Phil. Trans. R. Soc.</u> Lond., Brighton, v.296, p.375-85, 1982.
- PÜHLER, A.; AGUILAR, M.O. HYNES, M. MÜLLER, P. KLIPP, W.; PRIEFER, U.; SIMON, R.; WEBER, G. Advances in the genetics of free-living and symbiotic nitrogen fixing bacteria. In: VEEGER, C.; NEWTON, W.E.(eds) Advances in nitrogen fixation research. Martinus Nijhoff DRW Junk Publishers, The Hague Boston Lancaster Pudoc Wageningen, p. 609, 1984.
- PULAKAT, L.S.; GAVINI, N. Regulated expression of the *nifM Azotobacter vinelandii* in response to molybdenum and vanadium supplements in Burks nitrogen-free growth medium.<u>Biochem. Biophys.Res.Commum</u>. Orlando, v.264, p.186-190, 1999.
- QUIOCHO, F.A.; LEDVINA, P.S. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. <u>Mol.Microbiol.</u>, Oxford, v.20, p.17-25, 1996.
- RANGARAJ, P.; RUTTIMANN-JOHNSON, C.; SHAH, V.K.; LUDDEN, P.W. Biosynthesis of the iron-molybdenum and iron-vanadium cofactors of the

nif and vnf encoded nitrogenases. In: TRIPLETT, E.W. eds. <u>Prokaryotic</u> <u>Nitrogen Fixation A model system for the analysis of a Biological Process</u>. Madison: Horizon Scientific Press. p.55-79, 2000.

- RANGARAJ, P.; RYLE, M.J.; LANZILOTTA, W.M.; GOODWIN, P.J.; DEAN, D.R.; SHAH,V.K.; LUDDEN, P.W. Inhibition of iron-molybdenum cofactor biosynthesis by L127∆ Nifh and evidence for a complex formation between L127∆ NifH and NifNE. J.Biol.Chem., Baltimore, v.274, p.29413-29419, 1999b.
- RANGARAJ, P.; RYLE, M.J.; LANZILOTTA, W.N.; LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K. *In vitro* biosynthesis of iron-molybdenum cofactor and maturation of the *nif*encoded apodinitrogenase. <u>J. Biol.Chem.</u>, Baltimore, v.274, p.19778-19784, 1999a.
- RANGARAJ, P.; SHAH, V.K.; LUDDEN, P.W. ApoNifH function in ironmolybdenum cofactor synthesis and apodinitrogenase maturation. <u>Proc.</u> <u>Nat.Acad.Sci.</u>, Washington, v.94, p.11250-11255, 1997.
- RECH, S.; DEPPENMEIER, U.; GUNSALUS, R.P. Regulation of the molybdate transport operon, *modABCD* of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.177, p.1023-1029, 1995.
- RECH, S.; WOLIN, C. GUNSALUS, R.P. Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli*. <u>J.Biol.Chem</u>. Baltimore, v.271, p.2557-2562. 1996.

- REGO, F.G.M., Sequenciamento do gene nifB de H. seropedicae e caracterização de sua região promotora. Curitiba, 1997. 143p. Tese (Mestrado Ciências Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- REITZER, L.J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, Washington, v. 82, p. 1979-1983, 1985.
- RIBBE, M.; GADKARI, D.; MEYER, O. N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. J. Biol.Chem., Baltimore, v.272, p.26627-26633, 1997.
- ROBERTS, G.P.; MacNEIL, T.; MacNEIL, D.; BRILL, W.J. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. <u>J.Bacteriol</u>., Washington, v.136, n.1, p.267-279, 1978.
- ROBINSON, A.C.; DEAN, D.R.; BURGESS, B.K. Iron-molybdenum cofactor biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* requires the iron protein of nitrogenase. J.Biol. Chem., Baltimore, v.262, p. 14327-14332, 1987.
- ROBSON, R.L. Characterization of an oxygen stable nitrogenase complex isolated from *Azotobacter chroococcum* . <u>Biochem. J.</u>, London, v.181, p.569-575, 1979.

- ROBSON, R.L.; POSTGATE, J.R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. <u>Ann. Rev. Microbiol.</u>, Palo Seto, v.34, p.183-207, 1980.
- ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Structural genes for the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. <u>EMBO J.</u>, Oxford, v.8, n.4, p.1217-1224. 1989.
- ROBSON, R.L.; EADY, R.R.; RICHARDSON, T.H.; MILLER, R.W.; HAWKINS, M.; POSTGATE, J.R.; The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*, is a vanadium enzyme. <u>Nature</u>, v.322, p.388-390, 1986.
- RODRIGUEZ-QUINONES, F.; BOSCH, R.; IMPERIAL, J. Expression of the *nifBfdxNnifOQ* region of *Azotobacter vinelandii* and its role in nitrogenase activity. J. Bacteriol., Amsterdan, . v.175, p.2926-2935, 1993.
- ROLL, J.T.; SHAH, V.K.; DEAN, D.R.; ROBERTS, G.P. Characteristics of NifNE in *Azotobacter vinelandii* strains. <u>J.Biol.Chem</u>. Baltimore, v.270, p.4432-4437, 1995.
- ROSENTEL, J.K; HEALY, F.; MAUPIN-FURLOW, J.A.; LEE, J.H.; SHANMUGAN, K.T. Molybdate and regulation of *mod* (Molybdate Transport) *fdhF*, and *hyc* (Formate hydrogenlyase) operons in *Escherichia coli*. <u>J. Bacteriol</u>., Washington, v.177, p.4857-4864. 1995.
- RÜTTIMANN-JOHNSON, C,; STAPLES, C.R.; RANGARAJ, P.; SHAH, V.K.; LUDDEN, P.W. A vanadium and Iron cluster accumulates on VnfX during Iron-vanadium-cofactor synthesis for the vanadium nitrogenase in

Azotobacter vinelandii. <u>J. Biol. Chem</u>., Bethesda, v. 274, p.18087-18092, 1999.

- SAMBROOK , J. FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. <u>Molecular cloning a laboratory</u> <u>manual</u>. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULDON, A.R. DNA sequencing with chaintermination inhibitors. <u>Proc. Natl. Acad. Sci</u>., Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHIESSMAN, J.L.; HOWARD, J.B.; REES, D. Structure of ADP-AIF<sub>4</sub><sup>-</sup> - stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. <u>Nature</u>, v. 387, p. 370-376, 1997.
- SCHLESSMAN, J. L.; WOO, D.; JOSHUA-TOR, L., HOWARD, J.B.; REES, D.C. Conformational variability in structures of the nitrogenase iron proteins from *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. <u>J.Mol.Biol</u>., London, v.280, p.669-685, 1998.
- SCHNEIDER, K.; MULLER, A.; SCHRAMM, U.; KLIPP, W. Demosntration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK* delection mutant of *Rhodobacter capsulatus*. <u>Eur. J. Biochem</u>. Heidelberg, v.195, p.653-661, 1991.
- SCHOLLHORN, R ; BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N<sub>2</sub> fixation. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, Washington, v.58 , n.213-6, 1967.

- SELLMANN, D. Xray structure analysis of FeMo nitrogenase- Is the problem of N<sub>2</sub> fixation solved? <u>Angew.Chem Int. Ed Engl.</u>, Weinheim, v.32, n.1, p.64-7, 1993.
- SEVILLA, M.; MELETZUS, D.; TEIXEIRA, K.; LEE, S.; NUTAKKI, A.; BALDANI,I.; KENNEDY, C. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. <u>Soil. Biol.Biochem.</u>, v.29, p.871-874, 1998.
- SHAH, V.K.; STACEY, G.; BRILL, W.J. Electron transport to nitrogenase. J.Biol.Chem., Baltimore, v.19, n.19, p.12064-12068, 1983.
- SHAH, V.K.; ALLEN, J.R.; SPANGLER, N.J.; LUDDEN, P.W. *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Purification and characterization of NifB cofactor, the product of NifB protein. <u>J.Biol.Chem.</u>, Baltimore, v.269, p. 1554-1158, 1994.
- SHAH, V.K.; RANGARAJ, P.; CHATTERJEE, R.; ALLEN, R.M.; ROLL, J.T.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Requirement of NifX and other *nif* proteins for in vitro biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. <u>J.</u> <u>Bacteriol.</u>, Washington, v. 181, p. 2797-2801, 1999.
- SHEN, J.; DEAN, D.R.; NEWTON, W.E. Evidende for multiple substratereduction sites and distinct inhibitor-binding site from an altered *Azotobacter vinelandii* nitrogenase MoFe protein. <u>Biochemistry</u>, Washington, v. 36, p.4884-4894, 1997.

- SHINE, J.; DALGARNO,L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA : complementary to nonsense triplets and ribosome binding-sites. Proc. Natl. Acad.Sci. USA, Washington, v.71, p.1342-1346, 1974.
- SIDOTI, C.; HARWOOD, G.; ACKERMAN, r.; COPPARD, J.; MERRICK, M. Characterisation of mutations in the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation regulatory gene *nif*L which impair oxygen regulation. <u>Arch.</u> <u>Microbiol</u>., Heidelberg, v.159, p.276-281, 1993.
- SILVER, S.; WALDERHAUG, M. Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. <u>Microbiol.Rev</u>. Washington, v.56, p. 195-228, 1992.
- SIMON, H.M.; GOSINK, M.M.; ROBERTS, G.P. Importance of *cis* determinants and nitrogenase acitivity in regulated stability of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase structural gene mRNA. <u>J. Bacteriol.</u>, Washington, v.181, p.3751-3760, 1999.
- SIMON, H.M.; HOMER, M.J.; ROBERTS, G.P. Perturbation of *nifT* expression in *Klebsiella pneumoniae* has limited effect on nitrogen fixation. <u>J. Bacteriol.</u>
   Washington, v.178, p.2975-2977, 1996.
- SIMON, R., QUANDT J., KLIPP, W. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilisation of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. <u>Gene</u>, Amsterdan, v.80, p.161-169, 1989.

- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. <u>Bio Technology</u>, Londres, v. 1, p. 784-791, 1983.
- SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure f 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. <u>Science</u> Washington, v.224, p. 1095-1096, 1984.
- SIRKO, A.; HRYNIESVICZ, M; HULNICKA, D.; BOCK, A. Sulfate and thiosulfate tranport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. <u>J.Bacteriol</u>. Washington, v.172, p.3351-3357, 1990.
- SMITH, B.E.; EADY, R.R. Metalloclusters of the nitrogenases. <u>Eur.J.Biochem.</u>, Heidelberg, v.205, n.1, p.1-15, 1992.
- SMITH, B.E.; EADY, R.R.; LOWE, D.J.; GORMAL, C. The vanadium-iron protein of vanadium cofactor. <u>Biochem. J.</u>, London, v.250, p.299-302, 1988.
- SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nif* A-like gene and part of a *nif*B-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. <u>J.Gen. Microbiol.</u>, Reading, v.137, p.1511-1522, 1991.
- SOUZA, Emanuel Maltempi. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes nif A e nif B de Herbaspirillum seropedicae. Curitiba, 1990. 245p.
   Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. J. Bacteriol. Washington, v.181, p.681-684, 1999.
- SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.
  J. J. Promoters in the nodulation region of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. <u>Plant.Molec. Biol.</u> Dordrecht, v.9.; p.27-39, 1987.
- STADEN, R. Computer methods for DNA sequencers. In: HINDLEY, J.;WORTH,
   T.S.; BIVIDON, R.H. EDS. <u>DNA sequencing</u>, Amsterdam: Elsevier
   Biochemical Press, p.311-368, 1983.
- STEPHAN, M.P. OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETS, G;
   DOBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. <u>FEMS Microbiol.Lett.</u>, Amsterdan, v.77, p.67-72, 1991.
- SUNDARESAN, V.; AUSUBEL, F.M. Nucleotide sequence of the gene coding for the nitrogenase iron protein from *Klebsiella pneumoniae* . <u>J. Biol.Chem.</u>, Baltimore, v. 256, n.6, p.2808-2812, 1981.
- TEIXEIRA, Kátia Regina. Isolamento e caracterização do operon glnAntrBC de Herbaspirillum seropedicaeZ78. Curitiba, 1991. 108p. Tese (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- THOMPSON J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence aligment through sequence weighting,

position specific gap penalties and weight matrix choice. <u>Nucl.Acid.Res.</u>, Oxford, v.22, p. 4673-4680, 1994.

- THONY, B.; FISCHE, H.M.; ANTHAMATTEN, D.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixR-nifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type os activation. <u>Nucleic Acids Res</u>., Oxford, v.15, p.8479-8499, 1987.
- THORNELEY, R.N.F. ; LOWE, D.J. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. <u>Biochem J.</u>, London, v.215, p.393-403, 1983.
- THORNELEY, R.N.F. e LOWE, D.J. The mechanism of *Klebsiella pneumoniae* action. <u>Biochem J.</u>, London, v.224, p.887-894, 1984.
- TUBB, R.S.; POSTGATE, J.R.; Control of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. <u>J. Gen. Microbiol.</u>, Reading, v.79, p.103-117, 1973.
- UGALDE, R.A.; IMPERIAL, J.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Biosynthesis of iron-molybdenum cofactor inthe absence of nitrogenase. <u>J.Bacteriol</u>, Washington, v.159, n.3, p.888-893, 1984.
- UGALDE, R.A ; IMPERIAL,J.; SHAH.V.K.; BRILL, W.J. Biosynthesis of the ironmolybdenum cofactor and the molybdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae* :Effect of sulfur source. <u>J.Bacteriol</u>., Washington, v.164, p.1081-1087, 1985.

- WALKER, J.E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M.J.; GAY, N.J. Distantly related sequences in the  $\alpha$  and  $\beta$  of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. <u>Embo J.</u>, Oxford, v. 8, p.945-981, 1982.
- WANG, G.; ANGERMULLER, S.; KLIPP, W. Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.175, p.3031-3042, 1993.
- WASSEM, R.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter.<u>Microbiology</u>, aceito para publicação, 2000.
- WOLLE, D.; DEAN, D.R.; HOWARD, J.B. Ionic interactions in the nitrogenase complex. Properties of Fe-protein containing substitutions for Arg100.
   J.Biol.Chem., Baltimore, v.267, p.3667-3673, 1992.
- WONG, P.K.; POPHAM, D.; KEENER, J. KUSTU, S. In vitro transcription of the nitrogen fixation regulatory operon *nifLA* of *Klebsiella pneumoniae* <u>J.</u> <u>Bacteriol</u>, Washington, v. 169, p.2876-2880, 1987.
- WOOTTON, J.C.; NICOLSON, R.E.; COCK, J.M.; WALTERS, J.E.; BURKE, J.F.; DOYLE, W.A., BRAY, R. C. Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. <u>Biochem.Biophis.Acta</u>., Amsterdan, v. 1057, p.157-185, 1991.

- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STANLEY, G.; BURRIS, R.M.; EVANS, H.J. <u>Biological Nitrogen Fixation</u>. New york: Londres, 1992. 943p.
- YOUSAFZAI, F. K.; EADY, R.R. MgATP-independent hydrogen evolution catalysed by nitrogenase: an explanation for the missing electron(s) in the MgADP-AIF4 transition-state complex. <u>Biochem. J.</u>, Londres, v.339, p.511-505, 1999.
- ZHANG, Y., BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.174, n.10, p-3364-3369, 1992.
- ZHANG, Y., BURRIS, R.H.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Posttranslational of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.175, n.21, p.6781-6788, 1993.
- ZHENG, L.; WHITE, R.; CASH, V.; JACK, R. DEAN, D. Assembly of iron-sulfur clusters. J.Biol.Chem., Baltimore, v. 273, p. 13264-13272, 1998.
- ZHENG, L.; WHITE, R.; CASH, V.; JACK, R. DEAN, D. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. <u>Proc.</u> <u>Nat.Acad.Sci</u>. Washington, v.90, p.2754-2758, 1993.

- ZHENG, L.; WHITE, R.H.; DEAN, D.R. Purification of the Azotobacter vinelandii nifV-encoded homocitrate synthase. <u>J.Bacteriol.</u>, Washington, v.179, p.5963-5966, 1997.
- ZUMFT, W.G.; CASTILLO, F. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. <u>Arch. Microbiol.</u>, Heidelberg, v.117, p.53-60, 1978.