

ROSE ADELE MONTEIRO

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS
CENTRAL+C- TERMINAL DA PROTEÍNA
NIFA DE *Herbaspirillum seropedicae*.**

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

CURITIBA
1998

ROSE ADELE MONTEIRO

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS
CENTRAL+ C- TERMINAL DA PROTEÍNA
NIFA DE *Herbaspirillum seropedicae*.**

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

CURITIBA
1998

ROSE ADELE MONTEIRO

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS
CENTRAL+C-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE *Herbaspirillum*
seropedicae.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Dra. Leda Satie Chubatsu (Orientadora)
Universidade Federal do Paraná

Dra. Glaci Zancan
Universidade Federal do Paraná

Dr. Shigehiro Funayama
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Orientadores:

Prof^ª. Dra. Leda Satie Chubatsu

Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

A DEUS e

À minha família

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a professora Dra. Leda Satie Chubatsu, pela orientação, apoio, interesse, idéias, ajuda e amizade demonstrados.

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no grupo de Fixação de Nitrogênio, pelas sugestões e pelo interesse demonstrado.

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela ajuda, disponibilidade, interesse, idéias, amizade e carinho dispensados.

Aos Professores do laboratório de Fixação de Nitrogênio Prof^ª Dra. Liu Un Rigo, Dr. Marshall Geoffrey Yates, Dr. Shigehiro Funayama, Dr. Luiz Fernando Delboni, Dr. Hidevaldo Machado, pela ajuda, sugestões e amizade, e em especial para a Prof^ª Dra. Maria Berenice Steffens pelo carinho e pelos conselhos.

Aos coordenadores de Pós-graduação, Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira e Dr. Marcelo Iacomini pela colaboração dispensada.

Gostaria de agradecer a todos os professores da Pós-graduação em Bioquímica e em especial a Prof^ª Dra. Glaci Zancan pelo exemplo de sua dedicação a pesquisa.

Aos funcionários do Depto. de Bioquímica e às bibliotecárias pela colaboração e disponibilidade.

À amiga Maria Lúcia Ishida pela confecção das figuras 1 e 2 da introdução dessa tese.

Aos amigos de turma Darlene, Josiane, Leonardo, Liliane e Luciana pelo companherismo e amizade.

Aos amigos Geraldo Picheth e Cynthia Picheth pelo incentivo, amizade e carinho demonstrados.

Aos meus grandes amigos Fabiane e Valter pela ajuda, conselhos, força, dedicação e pelo carinho.

Aos meus queridos amigos e cúmplices Lilian, Luciano, Luiza, Carol e Mariana pela amizade, carinho, risadas, ajuda e dedicação mostrados.

Aos meus amigos Guilherme, priminho Renato, Cesar, Juliana, Humberto, Margareth e Caroline que sempre me incentivaram e deram força para continuar.

Aos amigos Gisele, Valma, Roseli Prado, Dona Ju, Patrícia, Fábio, Elaine e em especial as amigas Roseli Wassem e Elaine Benelli pela ajuda e amizade.

À minha família, em especial a minha mãe e meu pai que sempre me incentivaram, ajudaram, deram amor e torceram por mim.

Ao meu querido Johnny que sempre me deu força, amor e alegria quando eu precisei.

Agradeço também a Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pelos auxílios prestados e o apoio financeiro a CAPES, CNPq, FINEP-MCT-PRONEX/96.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
TABELA I	57
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Organização e função dos genes responsáveis pela fixação de nitrogênio	06
1.1.1. Genes <i>nif</i>	06
1.1.2. Genes envolvidos com a fixação de nitrogênio em <i>H. seropedicae</i>	09
1.1.3. Genes <i>fix</i>	10
1.2. Assimilação da amônia obtida no processo de redução de N ₂ atmosférico a NH ₃	12
1.3. Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema <i>ntr</i>	13
1.4. Regulação da expressão dos genes <i>nif</i>	17
1.4.1. Fatores que regulam a expressão do gene <i>nifA</i>	19
1.4.2. Controle da atividade da proteína NifA	20
1.5. Proteína NifA	22
1.5.1. Estrutura e função dos domínios da proteína NifA	22
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Bactérias e plasmídeos	28
3.2. Reagentes	30
3.3. Meios de cultura	30

3.4. Antibióticos	32
3.5. Subclonagem das sequências de DNA que codificam a	
proteína NifA e seus domínios no vetor de expressão pET28a	33
3.5.1. Preparação do vetor de expressão	33
3.5.1.1. Extração do vetor de expressão	33
3.5.1.2. Clivagem do vetor com enzimas de restrição	
para posterior ligação	34
3.5.1.3. Desfosfatização do vetor para posterior ligação	35
3.5.2. Preparação das sequências codificadoras para a proteína	
NifA e seus domínios	36
3.5.2.1. Amplificação de DNA por PCR	36
3.5.2.2. Clivagem de DNA amplificado com enzimas de restrição	37
3.5.3. Ligação do fragmento de DNA ao vetor de expressão pET28a	37
3.6. Transformação bacteriana por eletroporação	38
3.6.1. Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> para eletroporação	38
3.6.2. Transformação bacteriana	38
3.7. Purificação e análise de plasmídeos	39
3.8. Sequenciamento de DNA	40
3.8.1. Purificação de DNA dupla fita para sequenciamento	41
3.8.2. Reação de sequenciamento	42
3.8.3. Análise da sequência de DNA	43
3.9. Expressão da proteína NifA e de seus domínios em <i>E. coli</i>	43
3.10. Solubilização da proteína de fusão GST-Central+C-terminal da NifA	44
3.11. Purificação da proteína GST-Central+C-terminal pôr	

cromatografia de afinidade em resina GSH-Sepharose	45
3.12. Produção de anticorpos policlonais contra a proteína de fusão	
GST-Central+C-terminal da proteína NifA	46
3.12.1. Obtenção de anticorpos	46
3.12.2. “Imunobloting”	47
3.13. Purificação da porção solúvel da proteína	
His-Tag-Central+C-terminal	48
3.14. Ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal NifA à região	
promotora do gene nif B de <i>H. seropedicae</i>	49
3.14.1. Marcação radioisotópica do DNA com [³⁵S]	49
3.14.2. Marcação radioisotópica do DNA com [³²P]	50
3.14.3. Ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal	
NifA à região promotora do gene nif B de <i>H. seropedicae</i>	51
3.14.4. Determinação do retardamento da banda de DNA	
em gel de poliacrilamida	52
3.15. Ativação da transcrição <i>in vivo</i>	52
3.15.1. Atividade de β-galactosidase	53
3.16. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	54
4. RESULTADOS	55
4.1. Expressão das proteínas de fusão GST-N-terminal (pGLS1)	
e GST-Central+ C-terminal (pGLS2) de <i>H. seropedicae</i> em <i>E. coli</i>	55
4.2. Solubilização da proteína de fusão GST-Central+C-terminal	58
4.3. Purificação da proteína de fusão GST-Central+C-terminal	59
4.4. Produção de anticorpo policlonal contra a proteína de fusão	

GST-Central+C-terminal	63
4.5. Construção de plasmídeos recombinantes contendo sequências codificadoras para a preteína NifA, o domínio N-terminal e Central+C-terminal da NifA	66
4.6. Expressão das proteínas His-Tag-NifA e His-Tag-Central+C-terminal de <i>H. seropedicae</i> em <i>E. coli</i> estirpe BL21 (DE3) pLysS	67
4.7. Purificação da proteína His-Tag-Central+C-terminal por cromatografia de afinidade	71
4.8. Determinação da capacidade de ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal purificada ao promotor do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	73
4.8.1. Efeito da concentração de proteína na ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal à região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	73
4.8.2. Efeito da concentração de DNA de timo sobre a ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal a região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> marcada radioativamente	75
4.8.3. Efeito da concentração de DNA homólogo sobre a ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal a região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	77
4.9. Efeito das proteínas His-Tag-NifA e His Tag-Central+C-terminal sobre a expressão <i>in vivo</i> do promotor <i>nifH</i> de <i>K. pneumoniae</i>	79
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÃO	92

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICE 1	125
APÊNDICE 2	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genes <i>nif</i> em <i>K. pneumoniae</i> .	07
Figura 2 - Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema <i>ntr</i> na família Enterobacteriaceae.	16
Figura 3 - Esquema representativo da estrutura proteína NifA de <i>H. seropedicae</i>	24
Figura 4 - Padrão eletroforético das proteínas expressas pelos transformantes XLI-Blue (pGLS1), XLI-Blue (pGLS2) e XLI-Blue (pGEX2T).	56
Figura 5 - Ensaio de solubilização da proteína GST-Central+C-terminal com uréia.	60
Figura 6 - Purificação da proteína de fusão GST-Central+C-terminal da proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> .	62
Figura 7 - Análise de reconhecimento de anti soro anti proteína de fusão GST-Central+C-terminal	64
Figura 8 - Sequência do gene que codifica para a proteína NifA de <i>H. seropedicae</i> , com os "primers" utilizados na subclonagem (SOUZA <i>et al.</i> , 1991).	68
Figura 9 - Análise da expressão das proteínas His-Tag-NifA (pRAM1) e His-Tag-Central+C-terminal (pRAM2).	70
Figura 10 - Purificação da proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal.	72
Figura 11 - Ensaio de ligação da proteína solúvel His-Tag-Central+C-terminal com a região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i>	74

Figura 12 - Ensaio de ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal com a região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> na presença de DNA de timo.	76
Figura 13 - Ensaio de ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal com a região promotora do gene <i>nifB</i> de <i>H. seropedicae</i> na presença de DNA homólogo (<i>nifB</i>) não marcado.	78
Figura 14 - Ensaio de ativação da transcrição <i>in vivo</i> pelas proteínas His-Tag-NifA (pRAM1) e His-Tag-Central+C-terminal (pRAM2) do promotor <i>nifH</i> de <i>K. pneumoniae</i> em fusão <i>lacZ</i> (pRT22)	81
Figura 15 - Modelo do Mecanismo de Regulação da Fixação de Nitrogênio em <i>H. seropedicae</i> .	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina difosfato

ATP - adenosina trifosfato

β -Gal - β -Galactosidase

dATP - 5'-trifosfato de 2'-desoxiadenosina

dCTP - 5'-trifosfato de 2'- desoxicitosina

dGTP - 5'-trifosfato de 2'-desoxiguanina

dNTP - 5'-trifosfato de 2'-desonucleosídeos

dTTP - 5'-trifosfato de timidina

UMP - 5' monofosfato de uridina

DTT - ditionitrito

EDTA - ácido etilenodiamino-tetra-acético

IPTG - β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo

GST - glutationa S-transferase

GSH - glutationa reduzida

NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

Nif - fenótipo de capacidade de fixação de nitrogênio

ONPG - o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo

OPA - Tampão One Phor All da Pharmacia

PEG - polietileno glicol

RBS - sítio de ligação do ribossoma; do inglês "**R**ibosome **B**inding **S**ite"

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecilsulfato de sódio

TAE - tampão tris-acetato-EDTA

TRIS - tris(hidroximetil)-aminometano

UAS - sequência do ativador a montante, do inglês "Upstream Activator Sequence"

RESUMO

A proteína NifA é responsável pela ativação da transcrição dos operons *nif* em diazotrofos. Neste trabalho são apresentados resultados referentes a expressão e caracterização *in vivo* e *in vitro* dos domínios Central e C-terminal da proteína NifA *H. seropedicae*. Para a produção da proteína, dois sistemas foram utilizados: a expressão como proteína de fusão a glutathione S-transferase ou a um polipeptídeo contendo histidinas (His-Tag). A expressão da proteína de fusão GST-Central+C-terminal foi elevada, porém apresentou-se de forma insolúvel. Após processo de desnaturação e renaturação, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade e testada quanto a sua capacidade de ligação ao DNA, apresentando um resultado negativo. A proteína também foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais. Testes de "immunoblot" indicaram que os anticorpos reconhecem a proteína NifA nativa e seus domínios Central e C-terminal, não reconhecendo a proteína homóloga de *K. pneumoniae* ou a glutathione S-transferase. A proteína de fusão His-Tag Central+C-terminal também apresentou um elevado grau de expressão e mostrou-se parcialmente solúvel. Após cromatografia por afinidade, a proteína foi capaz de ligar-se a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* de forma específica. Ensaio *in vivo* em *E. coli*, utilizando fusões *nifH::lacZ*, mostraram que a proteína é capaz de ativar a transcrição na ausência de O₂ e independente da concentração de íons NH₄⁺. NifA íntegra, expressa e analisada nas mesmas condições, não mostrou capacidade de ativar a transcrição indicando a ausência de uma proteína reguladora para a sua atividade em *E. coli*.

1. INTRODUÇÃO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica, endofítica, gram-negativa, vibrióide e às vezes helicoidal. Essa bactéria pode ser encontrada no interior das raízes de milho, arroz e sorgo (BALDANI *et al.*, 1984 & BODDEY *et al.*, 1995) e também em colmos e folhas de arroz e cana de açúcar (PIMENTEL, 1991). Quando semeada em meio semi sólido, isento de nitrogênio fixado, ela cresce com formação de película e passa a apresentar a atividade de nitrogenase (BALDANI *et al.*, 1986). Essa bactéria é capaz de fixar nitrogênio em condições microaeróbicas (BALDANI *et al.*, 1986).

Quando essa bactéria foi inoculada em arroz foi observado um aumento de até 50% no peso seco da planta (BALDANI *et al.*, 1996). Esse resultado sugere que o *H. seropedicae* associado ao arroz possa contribuir com nitrogênio fixado para a planta, podendo estimular o seu crescimento.

H. seropedicae foi classificado primeiramente como uma nova espécie de *Azospirillum*. Após análise morfológica, bioquímica e comparação de ácidos nucleicos e padrão proteico da membrana foi possível concluir que pertencia a um novo gênero (BALDANI *et al.*, 1986; FALK *et al.*, 1986 e FU & BURRIS, 1989). A nitrogenase de *H. seropedicae* é mais tolerante a variações de pH e altas concentrações de oxigênio quando comparada com a de *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1986 e FU & BURRIS, 1989).

Os microrganismos diazotróficos são capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio, isto é eles são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia. Para que isso

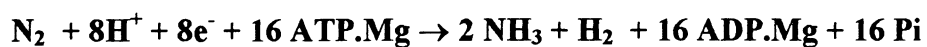
ocorra o microrganismo deve estar diante de condições favoráveis tais como, baixas concentrações de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio e temperatura adequada (POSTGATE, 1982). Os microrganismos diazotróficos são divididos em organismos de vida livre, simbióticos e associativos. Os de vida livre retiram energia da matéria orgânica do solo e em geral, estes microrganismos não excretam NH_4^+ (PEDROSA, 1987). Os simbióticos associam-se com plantas estabelecendo uma simbiose altamente benéfica entre microrganismo e planta, para a qual contribuem com nitrogênio fixado e recebem da planta produtos da fotossíntese. Os diazotrófos associativos estabelecem uma associação planta-bactéria que pode trazer outros efeitos benéficos para a planta pela produção de fito-hormônios, estimulando o crescimento do vegetal (PEDROSA, 1987 e OKON & VANDERLEYDEN, 1997). O interesse no estudo destes microrganismos diazotróficos associativos, como o *H. seropedicae*, tem crescido em vista do seu potencial como biofertilizante para gramíneas de interesse comercial como trigo, milho e arroz (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987).

A utilização de microrganismos diazotrófos como biofertilizantes é mais econômica e “ecologicamente correta” quando comparada com o uso de fertilizantes químicos nitrogenados. Estes últimos além de apresentarem um alto custo, podem causar danos ecológicos quando utilizados indiscriminadamente. O nitrato, derivado dos fertilizantes nitrogenados, pode causar uma alta contaminação dos reservatórios de água. O óxido nitroso liberado pela redução parcial do nitrato, juntamente com o CO_2 diminuem a perda de calor pela terra contribuindo para o chamado efeito estufa (POSTGATE, 1982; DIXON & WHELLER, 1986; PEDROSA, 1987; BODDEY *et al.*, 1995 e DOBEREINER, 1992 e 1997).

O estudo da fixação biológica de nitrogênio é de extrema importância pois todos os organismos vivos necessitam de nitrogênio para a biossíntese dos aminoácidos e das bases

púricas e pirimídicas, constituintes das proteínas e dos ácidos nucleicos. A crosta terrestre contém pouco nitrogênio numa forma assimilável e o N₂ atmosférico (80%) não é assimilável diretamente pela maioria dos seres vivos.

A fixação biológica de nitrogênio consiste na reação de redução do N₂ a NH₄⁺, catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase cuja estequiometria é mostrada abaixo (SIMPSON & BURRIS, 1984).



A nitrogenase é constituída por um complexo enzimático composto por 2 proteínas: a proteína ferro (proteína-Fe) e a proteína ferro-molibdênio (proteína-FeMo) (POSTGATE, 1982 e DEAN *et al.*, 1993). A proteína Fe é um homodímero constituído de 2 subunidades γ de massa molecular total de 60kDa e codificada pelo gene *nifH* (HOWARD *et al.*, 1989). Ela possui um núcleo FeS (Fe₄S₄) ancorado entre as duas subunidades e é responsável pela transferência de elétrons para a proteína FeMo, esta etapa é acoplada à hidrólise de ATP (YATES, 1980 e KIM *et al.*, 1993). Cada subunidade apresenta um motivo (GXXXXGKS-motivo A de Walker) comumente encontrado em proteínas que ligam nucleotídeos (o que explica a capacidade da proteína Fe de ligar Mg-ATP e Mg-ADP) (GEORGIADIS *et al.*, 1992; KIM & REES, 1994 e HOWARD & REES, 1994). O transportador de elétrons para a proteína

Fe pode ser uma flavodoxina ou uma ferredoxina, dependendo do microrganismo envolvido no processo de fixação de nitrogênio (DIXON & WHEELER, 1986).

A proteína-FeMo é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ de massa molecular de cerca de 220 kDa. A subunidade α , codificada pelo gene *nifD*, possui um massa molecular de cerca de 55 kDa e a subunidade β , codificada pelo gene *nifK*, cerca de 60 kDa (ROBERTS *et al.*, 1978 e KIM & REES, 1994). A proteína-FeMo contém 2 átomos de Mo, 30 átomos de Fe e 32 átomos de enxofre organizados em 2 tipos de núcleos metálicos: o agregado P (FeS) e o cofator ferro - molibdênio (Fe-Moco). Cada dímero $\alpha\beta$ contém um agregado P e um cofator FeMoco (KIM & REES, 1994 e SCHINDELI *et al.*, 1997).

Os elétrons aparentemente fluem da proteína-Fe para o agregado P da proteína-FeMo por um processo dependente de ATP.Mg^{+2} . A seguir, os elétrons são transferidos intramolecularmente do agregado P para o FeMoco, que é o sítio responsável pela ligação e redução do substrato (KIM & REES, 1994). Entretanto o mecanismo e o local exato onde a molécula de N_2 se liga ao FeMoco para ser reduzido ainda não estão esclarecidos. A redução da proteína FeMo é feita em etapas de transferência de um único elétron, sendo necessárias 8 etapas para a redução completa de N_2 a NH_3 . Portanto, são necessários oito ciclos de associação/dissociação das proteínas Fe e FeMo para tornar o sítio ativo da nitrogenase apto a reduzir uma molécula de N_2 a 2 moléculas de NH_3 .

Nos microrganismos *Rhodospirillum rubrum* (POPE *et al.*, 1985), *Rhodobacter capsulatus* (LOWERY *et al.*, 1986), *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* (HARTMANN & BURRIS, 1987) *Azotobacter chroococcum* a nitrogenase é inativada pela

presença de íons NH_4^+ através de um mecanismo pós-traducional que envolve a ligação covalente de um grupo ADP-ribosil a uma das subunidades da proteína-Fe.

A nitrogenase de *H. seropedicae* e *Azospirillum amazonenses* é inativada por amônia ou glutamina, mas o mecanismo de inativação parece ser diferente nessas bactérias (FU & BURRIS, 1989). Como em *H. seropedicae* não foi observado modificação covalente da proteína Fe, foi sugerido que a inativação da nitrogenase ocorra devido a um desvio do fluxo de elétrons (KLASSEN *et al.*, 1997).

A nitrogenase também pode ser inativada pelos níveis de O_2 , isso pode ocorrer de uma forma totalmente ou parcialmente irreversível, dependendo da concentração de O_2 e do tempo de exposição (EADY, 1980; ROBSON & POSTGATE, 1980 e HARTMAN & BURRIS, 1987).

Azotobacter vinelandii possui três tipos de nitrogenases (BISHOP *et al.*, 1980; PAGE & COLLINSON, 1982; HALES *et al.*, 1986a; HALES *et al.*, 1986b e CHISNELL *et al.*, 1988). A principal diferença estrutural entre as três nitrogenases são os seus componentes metálicos. A nitrogenase clássica contém molibdênio e ferro e é sintetizada quando o crescimento do microrganismo ocorre na presença de molibdênio. A nitrogenase 2 contém vanádio e ferro, essa nitrogenase é sintetizada quando o organismo cresce na presença de vanádio e na ausência de molibdênio. Esta nitrogenase também foi encontrada em *Azotobacter chroococcum*, *Rhodobacter capsulatus* e *Anabaena* (SCHNEIDER *et al.*, 1991). A nitrogenase 3 parece conter somente ferro, pois ela é sintetizada quando a bactéria cresce na ausência de molibdênio e vanádio (DRUMMOND, 1996).

A expressão desses três tipos de nitrogenase é reprimida por NH_4^+ e é regulada por molibdênio a nível de transcrição (DRUMMOND, 1996).

1.1. Organização e função dos genes responsáveis pela fixação de nitrogênio.

1.1.1. Genes *nif*

Em *K.pneumoniae* os genes *nif*, responsáveis pela fixação de nitrogênio, estão dispostos em 8 operons contíguos, compreendendo 20 genes denominados: *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifT*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifL*, *nifA*, *nifB*, *nifQ* (MERRICK, 1992 e 1993) (FIGURA 1).

Estudos comparativos dos genes *nif* de diversos microrganismos como *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Enterobacter agglomerans* e *K. pneumoniae* sugerem que existam pelo menos 14 genes *nif* comuns, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifB* e *nifQ*. Estes genes codificam para proteínas provavelmente essenciais para a biossíntese das proteínas do complexo nitrogenase (MERRICK, 1982).

Os genes *nifD* e *nifK*, codificam as subunidades α e β da proteína FeMo, enquanto o gene *nifH* codifica a proteína-Fe (ROBERTS *et al.*, 1978; HOLLAND *et al.*, 1987; IONNIDIS & BUCK, 1987). As propriedades estruturais e funcionais destas proteínas são altamente conservadas nos diferentes organismos (EMERICH & BURRIS, 1976).

Em *K. pneumoniae* a síntese do cofator FeMo (FeMoco) da proteína-FeMo necessita dos produtos dos genes *nifE*, *nifN*, *nifB*, *nifQ*, *nifV* e *nifH* (ROBERTS *et al.*, 1978, ALLEN *et al.*, 1993 e ROLL *et al.*, 1995).

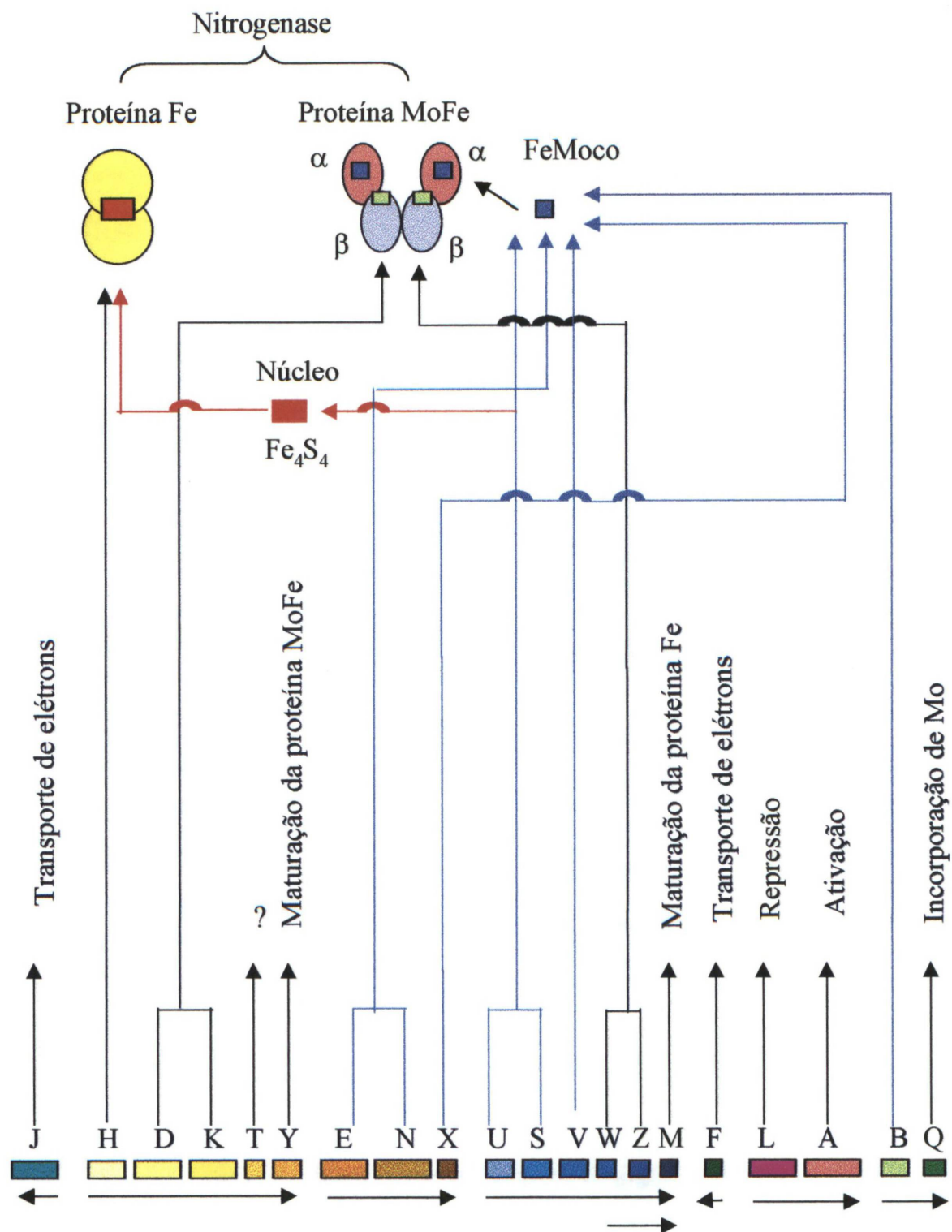


Figura 1: Genes *nif* em *K. pneumoniae*.

A proteína NifQ parece atuar na mobilização de molibdênio para a síntese de FeMoco (MERRICK, 1988). Talvez essa proteína possa auxiliar na formação da unidade MoFe_3S_3 do cofator FeMo (DEAN *et al.*, 1993).

A proteína NifB possui uma região rica em resíduos de cisteína, os quais parecem formar um sítio para ligação de metais (SIDDAVATTAM *et al.*, 1995). Provavelmente a proteína NifB fornece um precursor para a síntese de FeMoco (BUIKEMA *et al.*, 1987 e SHAH *et al.*, 1994).

A homocitrato sintase, produto do gene *nifV*, produz o homocitrato que é o componente orgânico do FeMoco (SHAH *et al.*, 1988 e WANG *et al.*, 1991).

Em *A. vinelandii* o gene *nifZ* talvez esteja envolvido no processamento e estabilidade da proteína FeMo (JACOBSON *et al.*, 1989).

O produto do gene *nifM* pode estar envolvido na maturação da proteína-Fe, quer na biossíntese do núcleo Fe_4S_4 ou na sua inserção na proteína-Fe (HOWARD *et al.*, 1986 e PAUL & MERRICK, 1989). Alguns estudos sugerem que a proteína NifM auxilia a proteína Fe a assumir uma conformação adequada para receber o grupo Fe_4S_4 (HOWARD *et al.*, 1986; HOWARD *et al.*, 1989 e GEORGIARDIS *et al.*, 1992).

Os produtos dos genes *nifUS* em *A. vinelandii* parecem estar envolvidos na captação e mobilização de ferro e enxofre necessários para a formação do núcleo Fe_4S_4 da proteína-Fe (JACOBSON *et al.*, 1989). A proteína NifS é o doador de enxofre na formação do grupo Fe-S da nitrogenase (DEAN *et al.*, 1993 e ZHENG *et al.*, 1993 e ZHENG & DEAN, 1994). Estudos sugeriram que a proteína NifU possa doar o grupo Fe_2S_2 para a forma imatura da proteína Fe e da proteína FeMo, ou ainda, pode ser a responsável pela manutenção do ferro em um estado apropriado de oxidação e poderia interagir com a proteína NifS (DEAN *et al.*, 1993).

Em *K. pneumoniae* a proteína NifJ juntamente com a proteína NifF atuam na transferência de elétrons do piruvato para a proteína-Fe (SHAH *et al.*, 1983).

As proteínas codificadas pelos genes *nifLA*, são responsáveis pelo controle da transcrição dos demais genes *nif*, sendo a proteína NifA ativadora de transcrição e a NifL anti-ativadora em *K. pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Azotobacter vinelandii* (MERRICK, 1983).

1.1.2. Genes *fix*

Os genes *fix* (o segundo grupo de genes responsáveis pela fixação de N₂) são encontrados nas espécies de *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* e são divididos em: *fixABCX*, *fixGHIS*, *fixLJ*, *fixK*, *fixNOPQ*, *fixR*, e *fixW* (MERRICK, 1992 e FISCHER, 1994).

Os genes *fixABCX* foram encontrados *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (GRÖNGER *et al.*, 1987), *R. leguminosarum* biovar *trifolii* (IISMAA *et al.*, 1989), *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (MICHIELS *et al.*, 1993), *R. meliloti* (EARL, *et al.*, 1987), *B. japonicum* (FUHRMANN *et al.*, 1985) e *A. caulinodans* (ARIGONI *et al.*, 1991). O produto dos genes *fixABCX* de *R. meliloti*, *B. japonicum* e *A. caulinodans* provavelmente está envolvido no transporte de elétrons para a nitrogenase (EARL *et al.*, 1987).

Os genes *fixNOPQ* foram primeiro descritos em *R. meliloti*. As sequências de aminoácidos dos seus produtos sugerem que constituem um complexo protéico que é necessário para manter a respiração do bacteróide em condições limitantes de oxigênio (MANDON *et al.*, 1994 e PREISIG *et al.*, 1993). Homólogos a esses genes (*fixNOPQ*)

também foram encontrados em *B. japonicum* (PREISIG *et al.*, 1993) e *A. caulinodans* (MANDON *et al.*, 1994).

Os genes *fixGHIS* foram encontrados em *B. japonicum* (PREISIG *et al.*, 1993), *A. caulinodans* (MANDON *et al.*, 1993b), *R. meliloti* (KAHN *et al.*, 1989). Os produtos desses genes provavelmente codificam para proteínas transmembranas (FISCHER, 1994). A proteína FixG parece estar envolvida em um processo redox, enquanto que a proteína FixI é uma bomba de cátions acoplada com uma reação redox catalisada pela FixG (KAHN *et al.*, 1989).

O gene *fixR* foi identificado em *B. japonicum* e está localizado a montante do gene regulatório *nifA*, formando um operon (THONY *et al.*, 1989). Existe a hipótese que a proteína FixR está envolvida na ativação e inativação redox-dependente da proteína NifA (BAKER, 1992 e FISCHER, 1994).

Em *R. meliloti* as proteínas FixL e FixJ (produtos dos genes *fixL*, *fixJ*) são necessárias para a ativação da transcrição dos genes *fixNOPQ*, *fixGHIS* e do gene *nifA* (DAVID *et al.*, 1988). Genes homólogos foram encontrados em *B. japonicum* (ANTHAMATTEN & HENNECKE, 1991), *A. caulinodans* (KAMINSKI & ELMERICH, 1991).

A proteína FixK (produto do gene *fixK*) de *Azorhizobium caulinodans* é um ativador de transcrição do gene *nifA* (KAMINSKI *et al.*, 1991).

1.1.3 Genes envolvidos com a fixação de nitrogênio em *H. seropedicae*.

Em 1989, Pedrosa e colaboradores, obtiveram resultados que permitiram sugerir a presença do gene *nifA* *H. seropedicae*. Em 1991, este gene foi sequenciado por Souza e

colaboradores, juntamente com parte do gene *nifB*. Rego (1997) sequenciou o restante do gene *nifB* e obteve resultados que demonstraram que a expressão do gene *nifB* necessita da proteína ativadora de transcrição NifA e de σ^N . Através de fusões *nifB::lacZ* foi demonstrado que a proteína NifA, na ausência de amônia e oxigênio, é a proteína ativadora desse promotor (REGO, 1997).

Os gene *nifHD* e parte do gene *nifK* também foram clonados e sequenciados por Machado e colaboradores (1995). A região promotora do gene *nifH* possui sítios potenciais de ligação para as proteínas RNA polimerase σ^N , IHF (fator de integração do hospedeiro) e NifA.

A análise da sequência da região contígua aos genes *nifHDK*; mostrou a presença dos genes *nifE*, *nifN*, *nifX*, ORF1, ORF2, *nifQ*, *modABCD*, *fixX* e *fixC* (KLASSEN *et al.*, 1997).

Os genes *glnAntrBC* (TEIXEIRA *et al.*, 1992) e *rpoN*, *glnB* e *glnD* (PEDROSA *et al.*, 1997) também foram isolados. Os genes *glnAntrBC* foram sequenciados por RIGO e colaboradores (STEFFENS *et al.*, 1997). O gene *glnB* foi sequenciado, caracterizado e a proteína PII (seu produto) foi purificada, caracterizada *in vitro*, cristalizada e teve a sua estrutura tridimensional analisada (BENELLI, 1997).

1.2. Assimilação da Amônia obtida no processo de redução de N_2 atmosférico a NH_3

A amônia formada no processo de redução de N_2 atmosférico é utilizada para a síntese da glutamina e do glutamato. Na maioria das células, o glutamato e a glutamina servem de doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas. Em procariotos as duas vias são: a) a glutamina sintetase (GS) (REAÇÃO 1) e a glutamato sintase (GOGAT) (REAÇÃO 2) e b) glutamato desidrogenase (GDH) (REAÇÃO 3) (MERRICK & EDWARDS, 1995).

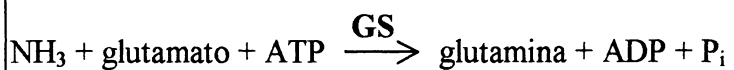
A glutamina sintetase (GS) catalisa a conversão do glutamato e da amônia em glutamina. Ela é uma enzima dodecamérica com subunidades idênticas de aproximadamente 55 kDa, sendo codificada pelo gene *glnA* (YAMASHITA *et al.*, 1989). A sua expressão e atividade estão sob o controle do sistema *ntr*. A glutamato sintase (GOGAT) catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o α -cetoglutarato para produzir 2 moléculas de glutamato, dependente de NAD(P)H. Essa enzima possui 2 subunidades diferentes, sendo que em *E. coli* uma subunidade tem massa molecular de 53 kDa e a outra 135 kDa. Essa enzima é codificada pelo gene *gltBD* (OLIVER *et al.*, 1987).

A GDH catalisa a aminação redutora do α -cetoglutarato pela amônia para originar o glutamato em uma reação dependente de NAD(P)H (KLEINER, 1981).

Na medida em que o K_m da GDH é de 1mmol/L e o do sistema GS/GOGAT de 0,1 mmol/L, a captação de NH_3 pelo sistema GDH só é efetiva em concentrações elevadas de NH_3 . Dessa maneira a via da GDH é utilizada quando as células crescem na presença de

nitrogênio e a via GS/GOGAT em condições limitantes de nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995).

REAÇÃO 1



REAÇÃO 2



REAÇÃO 3



1.3. Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema *ntr*.

O sistema *ntr* controla o metabolismo geral de nitrogênio, regulando a utilização de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos (DRUMMOND *et al.*, 1983).

Em enterobacteriáceas este sistema é composto por sete proteínas: NtrB (produto do gene *ntrB*), NtrC (produto do gene *ntrC*), GlnD (produto do gene *glnD*), proteína PII (produto

do gene *glnB*), GlnE (produto do gene *glnE*), GlnK (produto do gene *glnK*) e glutamina sintetase (produto do gene *glnA*). Essas proteínas interagem em um complexo mecanismo em cascata (MERRICK & EDWARDS, 1995).

A atividade das proteínas NtrB, NtrC e glutamina sintetase, é dependente da relação α -cetoglutarato/glutamina (BUENO *et al.*, 1985). Em baixas concentrações de íons amônio, quando a relação α -cetoglutarato/glutamina é alta, o α -cetoglutarato induz uma mudança conformacional na proteína PII, que adquire uma conformação ótima para a uridililação pela proteína GlnD. O produto do gene *glnD* possui duas atividades catalíticas dependendo do nível intracelular de nitrogênio fixado: em condições limitantes de NH_4^+ a proteína GlnD possui atividade de uridililtransferase e catalisa a adição do grupamento UMP à proteína PII, enquanto que em condições de excesso de NH_4^+ , GlnD adquire atividade de enzima removedora de UMP (DE MEL *et al.*, 1994). A proteína PII-UMP não interage com NtrB que, na sua forma livre, catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a. A proteína NtrC fosforilada (NtrC-P) é um ativador de transcrição do gene *nifA* e do operon *glnAntrBC* (*glnAp2*) de *K. pneumoniae* (REITZER & MAGAZANIK, 1985 e MAGAZANIK, 1989). PII-UMP interage com a adenililtransferase (ATase) que catalisa a desadenilação da glutamina sintetase (BROWN *et al.*, 1971; KAMBEROV *et al.*, 1995 e MERRICK & EDWARDS, 1995). A glutamina sintetase desadenilada passa então a produzir glutamina (KEENER & KUSTU, 1988).

Em condições de excesso de nitrogênio fixado a proteína GlnD liga glutamina, o que inibe sua atividade de uridililtransferase e ativa a de enzima removedora de UMP, favorecendo a desuridililação de PII (DE MEL *et al.*, 1994). A proteína PII desuridililada estimula a

atividade de fosfatase da proteína NtrB, que desfosforila NtrC-P, inativando-a. Ao mesmo tempo a PII desuridilada age sobre a ATase, que passa a catalisar a adenilação da glutamina sintetase. A glutamina sintetase adenilada é inativa (HAWKES *et al.*, 1985 e MERRICK & EDWARDS, 1995) (FIGURA 2).

A proteína NtrC faz parte do grupo de proteínas ativadoras de promotores σ^N dependentes. Em *K. pneumoniae* esta proteína é dimérica e o monômero possui 55kDa (HAWKES *et al.*, 1985 e DRUMMOND *et al.*, 1986) distribuídos em três domínios (DRUMMOND *et al.*, 1986 e NIXON *et al.*, 1986). A proteína NtrC é fosforilada no seu domínio N-terminal (WEISS & MAGASANIK, 1988; SANDERS *et al.*, 1992 e KLOSE *et al.*, 1993) e, embora NtrC seja capaz de se ligar ao DNA, apenas NtrC-P é capaz de ativar a transcrição (WEISS *et al.*, 1992 e WYMAN *et al.*, 1997). O domínio central desta proteína interage com o fator σ^N da RNA polimerase e hidrólisa ATP (SHIAU *et al.*, 1993 e MERRICK & EDWARDS, 1995). A atividade de ATPase é essencial para a formação do complexo aberto e início de transcrição (WEISS *et al.*, 1991; AUSTIN & DIXON, 1992 e MERRICK & EDWARDS, 1995). Finalmente domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice, que é responsável pela ligação ao DNA (CONTRERAS & DRUMMOND, 1988).

Em condições limitantes de nitrogênio fixado proteína NtrC fosforilada ativa a transcrição dos genes *glnAntrBC*, dos genes *nifLA* e de outros sistemas alternativos de assimilação de fonte nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995). Além disso a atividade da GS é estimulada pela desadenilação. Neste caso a captação de NH_4^+ é máxima. Quando os

níveis de NH_4^+ são altos, a síntese da glutamina sintetase é diminuída e sua atividade inibida por adenililação. Neste caso a principal via de assimilação de NH_4^+ pela glutamato desidrogenase (MERRICK & EDWARDS, 1995).

1.4. Regulação da Expressão dos Genes *nif*.

A expressão dos genes *nif* nos diazotrofos gram-negativos é dependente do produto do gene *rpoN* (HUNT & MAGASANIK, 1985). Este gene codifica uma subunidade σ alternativa da RNA polimerase, a subunidade σ^N (σ^{54} , RpoN e NtrA). Os promotores dos genes *nif* são dependentes do fator σ^N e possuem uma sequência conservada nas regiões -25/-24 e -13/-12 em relação ao início da transcrição (SASSE-DWIGHT & GRALLA, 1988; MERRICK & CHAMBERS, 1992 e FISCHER, 1994). A proteína σ^N forma um complexo com o núcleo da RNA polimerase e a holoenzima σ^N -RNA polimerase é capaz de se ligar ao DNA, formando um complexo binário fechado improdutivo. A passagem de complexo fechado a complexo aberto é obrigatoriamente dependente da presença de uma proteína ativadora *nif* específica, a proteína NifA. Este mecanismo de ativação dos genes *nif* é comum para todos os diazotrofos gram-negativos. Depois do início da transcrição a subunidade σ^N dissocia-se do complexo podendo então interagir com outras moléculas de RNA polimerase (TRAVERS & BURGESS, 1969).

A proteína NifA se liga a uma sequência conservada, localizada a montante do promotor -24/-12 (5' TGT-N₁₀-ACA-3') e denominada UAS (do inglês "upstream activator sequence" – sequência do ativador a montante). Essa sequência está presente na maioria dos

promotores dependentes de NifA e localiza-se a uma distância de 80 a 150 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição (MORRET & BUCK, 1988). Entretanto, nem todos os promotores dependentes da proteína NifA possuem uma sequência UAS óbvia. Por exemplo, não foram encontradas sequências UAS nas regiões promotoras dos genes *nifM* de *K. pneumoniae* (PAUL & MERRICK, 1987), *fixA* e *fixB* de *B. japonicum* (GUBLER & HENNECKE, 1988).

A sequência UAS juntamente com as sequências reconhecidas pela holoenzima σ^N -RNA polimerase formam uma região promotora ativa. Quando a distância entre o sítio de ligação da NifA e o promotor é aumentada em 5 bases (meia volta da hélice de DNA) a ativação do promotor pela proteína NifA foi significativamente diminuída. Este resultado indica que para que a NifA e a holoenzima σ^N -RNAPolimerase possam interagir é necessário que ambas as proteínas se liguem à UAS em uma face correta do DNA (BUCK *et al.*, 1987 e CANNON *et al.*, 1991). Aparentemente a função da UAS seria orientar corretamente a NifA para facilitar a interação com o complexo σ^N -RNAPolimerase e aumentar a concentração da proteína NifA na vizinhança do complexo fechado promotor -24/-12- σ^N RNAPolimerase (BUCK *et al.*, 1987).

A interação do complexo NifA-UAS com a holoenzima RNA polymerase σ^N envolve a formação de uma volta no DNA, aproximando a proteína ativadora ligada a UAS e a σ^N -RNA polimerase/ complexo fechado (BUCK *et al.*, 1987 e LEE *et al.*, 1993). O dobramento do DNA pode ser facilitado ou induzido pela ligação da proteína IHF (do inglês "Integration Host Factor"), o fator do hospedeiro de integração a uma sequência específica localizada entre o UAS e o promotor (BUCK *et al.*, 1987 e SANTERO *et al.*, 1989) e estimulando a transcrição.

Resultados obtidos por microscopia eletrônica indicaram que IHF dobra o DNA da região promotora do gene *nifH* de *K. pneumoniae*, mas não estimula a ligação da RNA polimerase σ^N ao promotor (HOOVER *et al.*, 1990).

Já que a expressão da subunidade σ^N parece ser constitutiva nos organismos estudados, a regulação da expressão do gene *nifA* e da atividade da proteína NifA parece ser o principal controle da regulação da ativação da transcrição dos genes *nif*. O nível de amônia, oxigênio e a disponibilidade de metais no meio parecem estar envolvidos neste sistema de regulação (MERRICK, 1992).

1.4.1. Fatores que regulam a expressão do gene *nifA* .

Em *K. pneumoniae* a ativação do gene *nifA* ocorre via proteína NtrC cuja atividade é controlada pelo sistema *ntr* (item 1.3) (MERRICK, 1992 e 1993). Em relação ao oxigênio a expressão é controlada pelo estado superenrolado do *pnifLA* o qual é afetado por anaerobiose (WHITEHALL *et al.*, 1992).

Nos microrganismos *R. meliloti* e *A. caulinodans* o sistema que regula expressão do gene *nifA* é constituído pelas proteínas FixL, FixJ, FixK e está sob o controle de oxigênio e não parece sofrer inibição por íons NH_4^+ (GILLES-GONZALES *et al.*, 1991 e FISCHER, 1994). As proteínas FixL e FixJ fazem parte de um sistema regulatório de dois componentes, onde a fosforilação está envolvida no processo de transdução de sinal (NIXON *et al.*, 1986) A proteína FixL parece ser um sensor transmembrana que modula a atividade da

proteína FixJ, uma proteína reguladora citoplasmática (DAVID *et al.*, 1988). A proteína FixJ é um regulador positivo da expressão do gene *nifA* e pode ativar diretamente o gene *nifA*, como em *R. meliloti*, ou ativar a transcrição do gene *fixK*, a proteína FixK, por sua vez, a transcrição do gene *nifA* em *A. caulinodans*. A proteína FixK também regula negativamente a transcrição do gene *nifA* em altos níveis de O₂ como ocorre em *R. meliloti* (FISCHER, 1994).

O gene *nifA* de *H. seropedicae*, possui uma sequência característica de promotor do tipo -24/-12, sítios de ligação para a proteína NifA e para a proteína NtrC (SOUZA *et al.*, 1991). Foram ainda identificados uma sequência homóloga à sequência consenso “anaerobox” localizada após o início de tradução e um sítio de ligação para a proteína IHF, localizado a jusante do sítio de ligação para a proteína NtrC (SOUZA *et al.*, 1991). A transcrição do gene *nifA* de *H. seropedicae* é ativada pela proteína NtrC, dependente da subunidade σ^N e regulada por amônia e não por oxigênio (SOUZA *et al.*, 1995a). Estudos dos sítios de ligação para a proteína NifA e para a proteína IHF, mostraram que esses dois sítios estão muito próximos e isso pode causar uma competição entre as proteínas IHF e NifA pela ligação ao DNA (WASSEM *et al.*, 1997).

1.4.2. Controle da atividade da proteína NifA.

Em *A. vinelandii* e *K. pneumoniae* a atividade da proteína NifA é inibida pela proteína NifL em resposta a altas concentrações de O₂ e NH₄⁺.

A proteína NifL é uma flavoproteína composta por dois domínios (DRUMMOND & WOOTON, 1987 e HILL *et al.*, 1996). O domínio N-terminal possui um grupamento flavina

ligado e está envolvido no sensoramento do estado redox da célula. Além disso é capaz de ligar ADP (HILL *et al.*, 1996). Aparentemente a proteína NifL, através do seu domínio C-terminal, interage com a NifA, inibindo-a (NARBERHAUS *et al.*,1995). Esse domínio apresenta uma clara homologia com a proteína sensora NtrB de *K. pneumoniae* e *B. parasponioae*.

Em *A. vinelandii* a NifL pode inibir a interação da NifA com a subunidade σ^N , além de impedir a formação do complexo aberto, inibir a atividade ATPásica (AUSTIN *et al.*, 1994 e BLANCO *et al.*, 1993) e diminuir a afinidade da proteína NifA pela sequência UAS (NARBERHAUS *et al.*, 1995).

A proteína NifA de *rhizobia* é inativada por altos níveis de oxigênio e pela privação de metais (MORRET *et al.*, 1991 e FISCHER,1994). Nestes microrganismos não foi detectada a presença do gene *nifL*. Em relação ao oxigênio, esta inibição pode ser devido a proteólise da NifA. Três genes *lon*, *snoB* e *snoC*, em *E. coli*, parecem afetar a degradação da NifA de *R. meliloti* em condições aeróbicas (HUALA *et al.*,1991). A inativação por O₂ pode estar relacionada com a presença da sequência Cys-X₁₁-Cys-X₁₉-Cys-X₄-Cys-, que não está presente nas proteínas NifA de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*. Este motivo é semelhante a um sítio de ligação de metais e pode constituir uma sequência sensora do estado redox intracelular (FISCHER *et al.*,1988). Por outro lado a atividade da proteína NifA parece não ser afetada pelos níveis de amônia (FISCHER,1994).

Finalmente a proteína NifA de *H. seropedicae* (SOUZA *et al.*,1995b), *A. brasilense* (ARSENE *et al.*,1996) e *R. capsulatus* (MASEPOHL *et al.*, 1988) tem a sua atividade controlada negativamente pelos níveis de oxigênio e pela concentração de amônia. Deficiência

de ferro, também afeta a atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* e *rhizobium* (SOUZA *et al.*, 1995b e FISCHER *et al.*, 1988). Nesses microrganismos ainda não foi detectada a presença do gene *nifL* ou seu produto. Novas evidências tem sugerido que a atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* (BENELLI, 1997) e *A. brasilense* (ARSENE *et al.*, 1996) possa ser controlada pela proteína PII.

1.5. Proteína NifA

A proteína NifA é ativadora específica da transcrição dos promotores *nif* σ^N dependentes (FISCHER, 1994). Esta proteína também ativa a transcrição dos genes *fixABCX* em *Rhizobium meliloti* (SZETO *et al.*, 1984) e *Bradyrhizobium japonicum* (GUBLER *et al.*, 1988) e do gene *mela* de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (HAWKINS *et al.*, 1988).

1.6.1. Estrutura e função dos domínios da proteína NifA

Análise comparativa da estrutura da proteína NifA de *K. pneumoniae* com as proteínas NtrC de *K. pneumoniae* e NifA de *R. meliloti* sugeriram a presença de 3 domínios estruturais separados por regiões interdomínios flexíveis (DRUMMOND *et al.*, 1986). Essa separação em

3 domínios é típica das proteínas ativadoras dependentes da subunidade σ^N (MERRICK, 1992), entre elas estão a NtrC, a DctD e a XylR (KUSTU *et al.*, 1989).

A proteína NifA de *H. seropedicae* possui cerca de 542 resíduos de aminoácidos (deduzidos do gene *nifA*) e apresenta três domínios: N-terminal, Central e C-terminal (Figura 3) (SOUZA *et al.*, 1991).

O domínio N-terminal das proteínas NifA de diferentes microrganismos varia entre 64 e 216 aminoácidos e possui um baixo grau de homologia (29 a 46% de identidade) (FISCHER, 1994). Excepcionalmente este domínio está ausente na NifA de *Rhizobium trifolii* (MERRICK *et al.*, 1992 e IISMAA & WATSON, 1989).

Em *K. pneumoniae*, o domínio N-terminal da proteína NifA parece antagonizar o efeito inibitório da proteína NifL sobre condições de desrepressão (DRUMMOND *et al.*, 1990). Esse domínio parece ter a mesma atividade sensora daquele da proteína NtrC (WEISS & MAGASANIK, 1988). O domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae* parece tratar-se de um sítio de regulação sensível a íons amônio (SOUZA *et al.*, 1995b). Esse domínio pode ser deletado sem interferir na capacidade ou atividade da proteína NifA, eliminando porém a inibição por amônia (SOUZA *et al.*, 1995b).

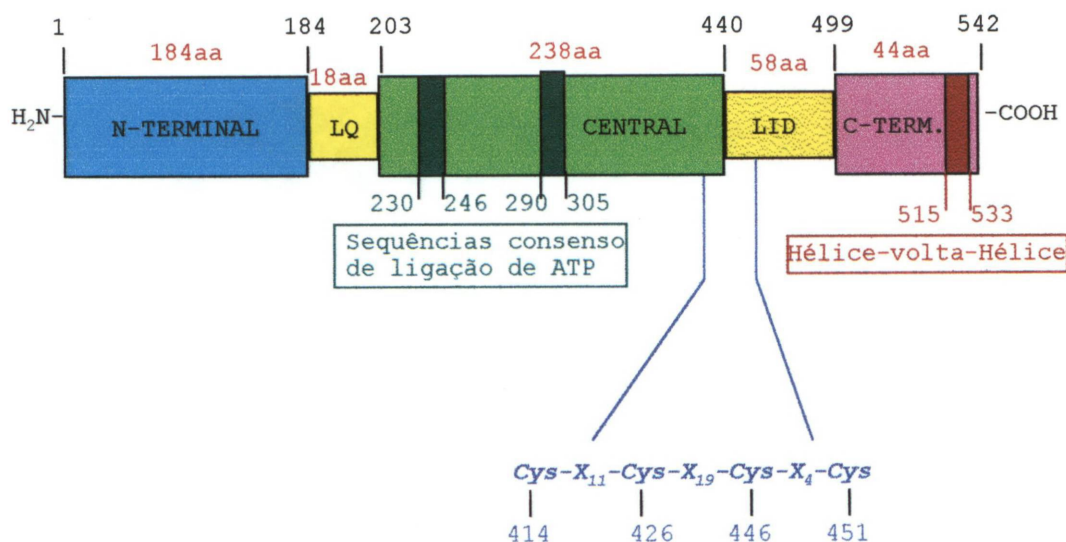


Figura 3: Esquema representativo da estrutura deduzida proteína da NifA de *H. seropedicae* (FISCHER *et al.*, 1994).

Os 3 domínios da proteína NifA são mostrados. Os números em vermelho indicam o número de aminoácidos correspondente a cada domínio ou interdomínio. LQ indica a sequência interdomínio entre os domínios N-terminal e Central, o LID indica a sequência interdomínio entre os domínios Central e C-terminal. As regiões contendo sequências consenso de ligação de ATP e o motivo hélice-volta-hélice também estão indicadas. A sequência Cys-X₁₁-Cys-X₁₉-Cys-X₄-Cys indica uma provável sequência para a ligação de metais (FISCHER *et al.*, 1988).

Em *Azospirillum brasilense* esse domínio aparentemente tem também uma função inibitória sobre a atividade da NifA na presença de amônia (ARSÈNE *et al.*, 1996). Por outro lado, a proteína NifA de *A. brasilense* sem o domínio N-terminal é menos ativa que a selvagem em condições de fixação de nitrogênio, sugerindo que esse domínio possa ser necessário para uma atividade ótima, provavelmente por manter os outros domínios em uma conformação mais favorável ou por aumentar a estabilidade da proteína (ARSÈNE *et al.*, 1996).

Os domínios N-terminal e central são separados por uma região interdomínio chamado de “Q-linker”, que é rico em resíduos de glutamina, arginina, ácido glutâmico, serina e prolina (WOOTTON & DRUMMOND *et al.*, 1989).

O domínio central da proteína NifA consiste de cerca de 240 aminoácidos. Este domínio possui uma alta homologia com a proteína NtrC (DRUMMOND *et al.*, 1986) e com outras proteínas ativadoras de promotores σ^N dependentes (FISCHER, 1994). Esta homologia é particularmente alta nas duas regiões potencial para ligação de ATP (DRUMMOND *et al.*, 1986 e SOUZA *et al.*, 1991).

Proteínas NifAs truncadas de *Rhizobium meliloti* e *Klebsiella pneumoniae*, apresentando apenas o domínio central, mantinham a capacidade de ativar a transcrição de promotores *nif* *in vivo* e *in vitro*, respectivamente (HUALA & AUSUBEL, 1989 e BERGER *et al.*, 1994), indicando que este domínio possa ser suficiente para este processo. Outros estudos sugerem que este domínio está envolvido na interação com a subunidade σ^N da RNA polimerase (KUSTU *et al.*, 1989), e que é o responsável pela formação do complexo aberto (LEE *et al.*, 1993). Modificações nos sítios potenciais de ligação do ATP da NifA de *K. pneumoniae* causaram a perda da atividade ATPásica e de formação do complexo aberto.

Estes dados indicam que a hidrólise de ATP é necessária para a formação do complexo aberto (CANNON & BUCK, 1992). Lee e colaboradores (1993) mostraram que a formação do complexo aberto não ocorre na presença de nucleotídeos não hidrolisáveis, confirmando a necessidade de hidrólise do ATP para o início da transcrição. Resultados adicionais utilizando uma proteína de fusão MBP-NifA de *K. pneumoniae*, mostraram que a NifA é capaz de utilizar ATP, GTP, UTP e CTP para ativar a transcrição (LEE *et al.*, 1993).

Os domínios central e C-terminal das proteínas NifA de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* estão ligados diretamente. Nas proteínas NifA de *Rhizobium spp*, *B. japonicum*, *A. caulinodans*, *R. capsulatus*, *A. brasilense* e *H. seropedicae* os domínios central e C-terminal estão conectados por uma sequência interdomínio de 32 a 44 resíduos. Este interdomínio (LID) possui duas cisteínas que, juntamente com mais duas cisteínas do domínio central formam uma sequência Cys-X₁₁-Cys-X₁₉-Cys-X₄-Cys- que constitui um sítio de ligação de metais em potencial. Alterações nesta região deram origem a proteínas NifA inativas e foi proposto que íons ferro possam se ligar nesse sítio formando um sítio sensível a variações no potencial redox intracelular e pode estar envolvido na sensibilidade da proteína NifA à inativação por oxigênio (FISCHER *et al.*, 1988 e 1989 e SOUZA *et al.*, 1995b).

O domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado o qual está envolvido na ligação ao DNA (LEE *et al.*, 1993). Este domínio possui uma grande homologia com o domínio C-terminal da proteína NtrC, como descrito por Drummond e colaboradores (1986). Morret e colaboradores (1988) demonstraram que a integridade do domínio C-terminal é necessária para a máxima ativação da transcrição dos genes *nif*.

2. OBJETIVOS

A proteína NifA exerce um papel fundamental no controle da fixação biológica de N₂, pois é responsável pela ativação da transcrição dos genes *nif*, entretanto a sua regulação não é igual em todos os sistemas. Devido a isso essa proteína tem sido alvo de estudos em muitos microrganismos.

Uma das dificuldades da caracterização *in vitro* da proteína NifA é a sua insolubilidade quando superexpressa em *E. coli*. Outro fator é a sensibilidade ao O₂ apresentada por esta proteína quando ensaiada *in vivo*.

A caracterização da NifA de *H. seropedicae* permitiria a obtenção de maiores informações sobre a regulação da fixação de N₂ neste organismo. Dessa maneira, a proposta desse trabalho foi caracterizar a proteína de NifA de *H. seropedicae* através de alguns ensaios *in vivo* e *in vitro*, sendo estabelecidos os seguintes objetivos:

- Subclonar o gene *nifA* intacto de *H. seropedicae* e as regiões codificadoras dos domínios N-terminal e Central+C-terminal.
- Expressar e purificar os domínios Central+C-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*.
- Produzir anticorpos policlonais contra os domínios Central+C-terminal da proteína NifA.
- Determinar a capacidade de ligação dos domínios Central+C-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* ao DNA *in vitro*.
- Determinar a atividade de ativação de transcrição da proteína NifA e dos domínios Central+C-terminal *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Bactérias e plasmídeos

- *Escherichia coli*

BL21 (DE3) *pLysS* → *hsdS gal (λcIts 857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)* (produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs) (SAMBROOK *et al.*, 1989)

JM109 (DE3) → *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]* (JM109 produtora da RNA polimerase do fago T7) (SAMBROOK *et al.*, 1989)

XL1-Blue → *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15Tn10(*tef'*)]* (SAMBROOK *et al.*, 1989)

- Plasmídeos

Plasmídeos	Características	Referência/Origem
pGEX-2T (apêndice 1)	Gera proteína de fusão com GST. Amp ^R	Pharmacia
pET28a (apêndice 2)	Gera proteína de fusão com His-Tag. Km ^R	Novagen
pGLS2	Contém a sequência codificadora do domínio Central+C-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> . subclonada no pGEX2T/Amp ^R	Leda S. Chubatsu (resultados não publicados)

Plasmídeos	Característica	Referência/Origem
pRAM1	Contém a sequência codificadora da NifA de <i>H.seropedicae</i> subclonada no pET28a/Km ^R	Este trabalho
pRAM2	Contém a sequência codificadora do domínio Central+C-terminal da NifA de <i>H.seropedicae</i> subclonada no pET28a/Km ^R	Este trabalho
pRAM3	Contém a sequência codificadora do domínio N-terminal da NifA de <i>H.seropedicae</i> subclonada no pET28a/Km ^R	Este trabalho
pNH11	Contém o gene <i>nifA</i> ^c <i>K. pneumoniae</i> /Cb ^R	AUSTIN <i>et al.</i> , 1990
pDK7	Contém o gene <i>nifA</i> <i>H. seropedicae</i> /Km ^R , vetor pDK6	Emanuel M. Souza (resultados não publicados)
pRT22	<i>nifH</i> (<i>K pneumoniae.</i>)::lacZ Cm ^R	TULI& MERRICK, 1988
pEMS130	contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pTZ18R/Amp ^R	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997

3.2. Reagentes

Os antibióticos, trizma-base, o-nitrofenil β -D-galactopiranosideo (ONPG), ficoll e isopropiltio- β -D-galactosideo (IPTG) foram adquiridos da Sigma Chemical Company. As enzimas modificadoras de DNA e RNase foram adquiridas de Pharmacia Biotech, Bethesda Research laboratories Inc. (BRL), Boehringer Mannheim Biochemicals. Para a análise de DNA foram utilizados os padrões de massa molecular “1Kb ladder” adquirido da GIBCO-BRL. Para a análise de proteína foram utilizados padrões da Pharmacia Biotech ou marcadores pré-corados da Sigma Chemical Company. Fenol, etanol, metanol, clorofórmio, isopropanol, ácido acético glacial e álcool isoamílico foram adquiridos de Merck. Extrato de levedura, triptona, ágar bacteriológico foram adquiridos da Biobrás. O gás nitrogênio super seco foi adquirido da White Martins S.A. Os demais reagentes foram para análise e de alto grau de pureza.

3.3. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados no cultivo das estirpes de *E. coli* foram Luria-Broth (LB), Terrific-Broth (TB) (SAMBROOK *et al.*, 1989) e Nitrogen-Free Davis and Mingioli (NFDM) (CANNON *et al.*, 1976).

O meio LB apresenta a seguinte composição:

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

O meio sólido foi obtido pela adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido, sendo denominado LA.

O meio TB apresenta a seguinte composição:

Bacto-triptona	12g/L
Extrato de levedura	24g/L
Glicerol	4 mL em 1L
Solução fosfato (adicionada depois da autoclavação)	100mL
0,17M KH_2PO_4	2,32g em 100mL
0,72M K_2HPO_4	12,54g em 100mL

O meio mínimo (NFDm) apresenta os seguintes componentes:

	gramas/litro
K_2HPO_4	12,06
KH_2PO_4	3,4
MgSO_4	0,1

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025
Glucose	20,0

A solução concentrada dos fosfatos ($\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) foi autoclavada separadamente e adicionada ao meio no momento do uso.

3.4. Antibióticos

Os antibióticos utilizados foram:

	Solução estoque (mg/mL)	Concent. final ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido nalidíxico (Nal)	10	10
Ampicilina (Amp)	100	200
Canamicina (Km)	50	50
Cloranfenicol (Cm)	30	30

As soluções estoques de antibióticos, exceto cloranfenicol, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,23 μm). A solução

estoque de cloranfenicol foi preparada em etanol 70%. Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -20°C .

3.5. Subclonagem das sequências de DNA que codificam a proteína NifA e seus domínios no vetor de expressão pET28a.

Para a construção dos plasmídeos de fusão foi utilizado o vetor de expressão pET28a. Este vetor contém uma sequência de nucleotídeos que codifica para um polipeptídeo de 24 aminoácidos contendo 6 resíduos de histidina (His-Tag) que pode ser fundida à sequência genética de interesse. A expressão desta construção produz uma proteína de fusão com um His-Tag ligado ao N-terminal da proteína de interesse. Essa expressão é direcionada a partir do promotor do fago T7 e, portanto, a bactéria recipiente deve ser capaz de sintetizar a RNA polimerase de fago T7.

3.5.1 Preparação do vetor de expressão.

3.5.1.1. Extração do vetor de expressão

A extração do vetor pET28a da bactéria *E.coli* estirpe XL1-Blue foi feita segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Trinta mililitros de cultura crescida em

meio Luria Broth (LB) durante a noite foi centrifugada a 10000xg por 5 minutos a 4°C. O sedimento de células foi ressuspensão em 2,5mL de GET (50mmols/L glicose, 25mmols/L Tris-HCl pH8,0 e 10mmols/L de EDTA pH8,0) e a lise efetuada com a adição vagarosa de 2mL de SDS 1% e NaOH 0,2mol/L. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados através da adição de 3mL de acetato de potássio 3mols/L pH4,8 e incubação por 10 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13000xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e o DNA plasmidial foi precipitado com a adição de 5mL de isopropanol e incubação por 10 minutos a -20°C. Após esse período a mistura foi centrifugada a 13000xg por 5 minutos, o precipitado foi seco a vácuo e ressuspensão em 400 µL de água. RNase (10µg) foi adicionada e a amostra foi incubada a 37°C por 50 minutos. A solução sofreu extração com fenol:clorofórmio:alcool isoamílico (25:24:1) uma vez e clorofórmio uma vez. Após a extração o plasmídeo foi precipitado com 1mL de etanol absoluto a -20°C durante a noite. Após centrifugação, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspensão em 200µL de água.

3.5.1.2. Clivagem do vetor com enzimas de restrição para posterior ligação.

A digestão do vetor foi feita segundo protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Foram utilizados 50µL de DNA, 10µL de Tampão React3 Gibco-BRL (50mmols/L Tris-HCl pH8,0, 10mmols/L MgCl₂ e 100mmols/L NaCl), 0,5µL de *Bam*HI (10U) e água para

100µL. A reação foi incubada durante 1 hora e 30 minutos a 37°C. A enzima foi inativada a 85°C por 20 minutos.

3.5.1.3. Desfosforilação do vetor para posterior ligação.

A desfosforilação (SAMBROOK *et al.*,1989) foi feita utilizando 0,7U da enzima fosfatase alcalina de bezerro (CAP), 100µL de DNA, 35µL de água e 15µL de Tampão 10XOPA da Pharmacia (100mmols/L Tris-acetato pH7,5, 100mmols/L acetato de magnésio e 500mmols/L de acetato de potássio), a mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora e 30 minutos. Após incubação foram adicionados 15µL de SDS10%, 3µL de EDTA 0,5mols/L e 1µL de proteinase K (20mg/mL). Essa reação foi então incubada a 50°C por 30 minutos, com o objetivo de degradar a CAP. Após incubação foram feitas extrações uma vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com clorofórmio. O DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 50µL de água.

Para verificar se o DNA foi desfosforilado, uma pequena alíquota foi incubada na presença de 0,5U de T4 DNA ligase e testada quanto a sua capacidade de transformação.

3.5.2. Preparação das sequências codificadoras para a proteína NifA e seus domínios.

3.5.2.1. Amplificação de DNA por PCR.

A amplificação do gene que codifica para a proteína NifA e das sequências correspondentes aos seus domínios separadamente ou em conjunto foi feita utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os “primers” (Figura 8) utilizados foram oligonucleotídeos sintetizados quimicamente (Gene Assembler da Pharmacia), apresentando trocas de nucleotídeos visando a introdução de sítios de restrição na sequência desejada para facilitar a subclonagem no vetor de interesse.

Para a reação de amplificação foram utilizados tampão Gibco PCR (20mmols/L Tris-HCl pH8,4 e 50mmols/L KCl), 0,2mmols/L dNTPs, 10pmols de cada oligonucleotídeo, 1,5mmols/L MgCl₂, 20ng de DNA e 1U de Taq polimerase (Gibco) em um volume final de reação de 50 µL. Os parâmetros utilizados para a reação de amplificação do DNA foram: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C; 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1,5 minutos a 30°C e 3 minutos a 72°C; 1 ciclo de 45 segundos a 94°C; 1 minuto a 30°C e 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação a reação foi extraída com 1 volume de clorofórmio e o DNA precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e ressuspendido em 45µL de H₂O. Para a checagem da amplificação foram feitas eletroforeses em agarose 1% utilizando tampão TAE 1X (0,04mols/L Tris-acetato e 0.001mols/L EDTA pH8,0).

3.5.2.2. Clivagem do DNA amplificado com enzimas de restrição.

As reações de clivagem de DNA por enzimas de restrição foram feitas de acordo com procedimento recomendado pelo fabricante (Gibco-BRL/ Pharmacia). Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram digeridos com a enzima *BamHI* utilizando como tampão de restrição 2XOPA da Pharmacia (20mmols/L Tris-acetato pH7,5, 20mmols/L acetato de magnésio, 100mmols/L acetato de potássio). Em um sistema de 60µL foram utilizados 45µL de fragmento de DNA amplificado, tampão de restrição e 0,5µL (10U) de *BamHI*. Esta reação foi incubada por 4 horas a 37°C.

Após a incubação o DNA foi extraído com 1 volume de fenol:clorofórmio:alcool isoamílico (25:24:1), sendo então precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco a vácuo. O precipitado foi ressuspenso em 25µL de H₂O.

3.5.3. Ligação do fragmento de DNA ao vetor de expressão pET28a.

O fragmento de DNA amplificado e digerido foi ligado ao vetor pET28a numa proporção de 10:1 (volume), na presença de tampão T4 DNA ligase 1X - Gibco-BRL (50mmols/L Tris-HCl pH 7,6, 10mmols/L MgCl₂, 1mmol/L DTT, 0,5mmol/L ATP e 5%PEG 8000) e 0,8U de T4 DNA ligase. O sistema foi incubado a 4°C durante 12 horas.

3.6. Transformação bacteriana por eletroporação.

3.6.1. Preparo de células competentes de *E. coli* para eletroporação.

Quinhentos mililitros de meio líquido LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura crescida durante 12h. A cultura foi incubada sob agitação a 37°C até atingir uma D.O₆₀₀ entre 0,5 e 1.0. Após crescimento, a cultura foi mantida no gelo durante 15 minutos e, em seguida, centrifugada a 4.000xg por 15 minutos. As células foram lavadas uma vez com 500mL de H₂O estéril, uma vez com 250mL de H₂O estéril, sendo então ressuspensas em 10 mL de glicerol 10%. Após centrifugação a 4000xg por 15 minutos, o sedimento de células foi ressuspensado em 1 mL de glicerol 10% sendo então fracionados em amostras de 40µL. As alíquotas foram armazenadas a -70°C.

3.6.2. Transformação bacteriana.

Para transformação bacteriana, 1µL da mistura da ligação foi adicionada a 40µL da suspensão de células eletrocompetentes, mantendo-se a mistura no gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BRL) sendo submetidas a um campo elétrico (4KΩ, 330µF) a fim de permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1mL de meio LB e

incubadas a 37°C, sob agitação por 1 hora. Após incubação, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo o antibiótico desejado a fim de selecionar os transformantes. A estirpe XL1-Blue foi a primeira escolha na transformação, pois ela é uma bactéria *recA*⁻. As bactérias BL21(DE3) *pLysS* e JM109(DE3) só foram utilizadas para a expressão da proteína de interesse quando o vetor de expressão utilizado possuía o promotor da RNA polimerase de fago T7. O método utilizado foi o descrito pelo fabricante (Gibco-BRL).

3.7. Purificação e análise de plasmídeos

A extração dos plasmídeos para análise da *E. coli* estirpe XL1-Blue em pequena escala foi feita segundo o método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Três mililitros de uma cultura crescida durante aproximadamente 12 horas foram centrifugadas a 13000xg por 2 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 200µL de GET (50mmols/L glicose, 25mmols/L Tris-HCl pH 8,0, 10mmols/L de EDTA pH8,0). A lise foi então efetuada com 200µL de SDS 1% e NaOH 0,2mols/L adicionados vagarosamente. Em seguida 400µL de acetato de potássio 3mols/L pH 4,8 foram acrescentados e após homogeneização a mistura foi mantida durante 10 minutos no gelo. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000xg por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial, foi separado sendo então precipitado pela adição de 600µL de isopropanol. Depois de 15 minutos a -20°C as amostras foram centrifugadas a 13000xg por 5 minutos, o precipitado

foi ressuspendido em 200µL de H₂O. Os plasmídeos foram então precipitados com 600µL de etanol absoluto por 1 hora a -20°C. Após centrifugação a 13000xg por 5 minutos o precipitado foi lavado com etanol 80%, novamente centrifugado (13000xg/5 minutos) e seco a vácuo. O precipitado foi dissolvido em 50µL de água.

Para a análise os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas, segundo procedimento recomendado pelo fabricante (Gibco/BRL, Pharmacia).

3.8. Sequenciamento de DNA.

A reação de sequenciamento é baseada no método de Sanger (SANGER & COULSON,1975), aonde dideoxynucleotídeos fluorescentes são utilizados como terminadores de cadeia.

A leitura dos produtos da reação de sequenciamento de DNA foi feito utilizando um Sequenciador Automático de DNA, Applied Biosystem Modelo AFS310 o qual utiliza cromóforos fluorescentes como terminadores de cadeia, eletroforese em coluna capilar e detecção a laser.

3.8.1. Purificação de DNA dupla fita para sequenciamento.

Um mililitro e meio de uma cultura, crescida por 10-12 horas em meio TB, foram centrifugadas a 10000rpm por 1 minuto. O precipitado foi ressuspenso em 100µL de GET (50mmols/L glicose, 25mmols/L Tris-HCl pH 8,0, 10mmols/L de EDTA pH8,0). A lise foi então efetuada com 200µL de SDS 1% e NaOH 2mols/L adicionados vagarosamente. Então, 200µL de acetato de potássio 3mols/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8mols/L foram acrescentados e após homogeneização, a mistura foi mantida por 10 minutos no gelo. Após esse período, foram acrescentados 100µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e as amostras centrifugadas a 10000rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi separado sendo então precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto. Depois de 20 minutos à temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 10000rpm por 5 minutos. O DNA precipitado foi lavado 2 vezes com 1mL de etanol 80%, novamente centrifugado (10000rpm/5 minutos), seco a vácuo e posteriormente, ressuspendido em 150µL de água. RNase (100µg) foi acrescentada e a mistura incubada a 37°C por 3 horas. Após incubação, foram acrescentados 2,5mols/L de acetato de amônio e a mistura foi mantida no gelo por 10 minutos. Em seguida, a preparação de DNA foi extraída com 100µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) por duas vezes. Em seguida, o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto a temperatura ambiente por 20 minutos, centrifugado, e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 80%, seco a vácuo, e finalmente

ressuspendido em 8µl de água. A qualidade do DNA foi verificada através de eletroforese em agarose 0,7%.

3.8.2. Reação de Sequenciamento.

A reação de sequenciamento continha um microlitro do DNA (1-5µg) purificado, 2,62µL de tampão TACS (Perkin Elmer-Tris-Cl 106mmols/L, MgCl₂ 2,6mmols/L e (NH₄)₂SO₄ 26,6mmols/L), 6µL de mistura para sequenciamento (Terminator Ready Rxn Mix-Perkin Elmer), 10pmol do "primer" (pGEX3', pGEX5' (apêndice 1); HsnifA 4 e HsnifA2A (figura 8) e água para volume final de 20µL. A mistura de reação foi colocada no termociclador cujos parâmetros foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 40°C e 6 minutos a 65°C.

O produto da reação de sequenciamento foi então transferido para um tubo tipo eppendorf de 1,5mL sendo acrescentado 2,5mols/L de acetato de amônio e 80µL de etanol absoluto, mantendo-se a mistura no gelo por 15 minutos. Após centrifugação por 15 minutos o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 80%, seco a vácuo e ressuspendido em 15µL de tampão TSR (Perkin-Elmer). Esse volume foi transferido para tubo eppendorf de 200µL e o DNA desnaturado (96°C por 2 minutos) e imediatamente resfriado em gelo, sendo então colocado no sequenciador automático de DNA Applied Biosystems Modelo AFS310.

3.8.3. Análise da sequência de DNA.

Após o sequenciamento, a análise de comparação de sequências foi feita utilizando o programa BLAST Search (GenBank/NCBI)(ALTSCHUL *et al.*, 1990) ou o programa Clustal (THOMPSON *et al.*, 1994).

3.9. Expressão da proteína NifA e de seus domínios em *E. coli*.

Dez mililitros de meio LB foram inoculados na proporção 1/100 com uma cultura crescida durante a noite. As células foram crescidas a 37°C sob agitação constante até DO₆₀₀ aproximadamente igual a 1,0. Neste ponto foi adicionado IPTG para concentração final de 0,5mmols/L ou 0,5% (p/v) de lactose, seguido de incubação sob agitação constante a 30°C por cerca de 3 horas. Após esse período as células foram recuperadas por centrifugação a 5000xg por 5 minutos a 4°C. Para a análise das proteínas, o sedimento de células foi ressuspenso em 400µl de tampão (100mmols/L KCl, 50mmols/L Tris-HCl pH 8,0, 1mmols/L DTT e 10% glicerol e 20mg/mL de lisozima) e as células lisadas através de sonicação utilizando um sonicador (Heat System) equipado com uma micropona em 6 ciclos de 20 segundos sobre o gelo. Após a lise, a mistura foi centrifugada a 13000xg por 10 minutos a 4°C e as frações solúvel e insolúvel separadas.

As proteínas foram analisadas através de separação eletroforética em géis de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) segundo procedimento descrito por Laemmli (1970).

Foram também testados tempos diferentes de indução, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas, assim como concentrações variadas de IPTG entre 0,1mmols/L e 1mmol/L.

3.10. Solubilização da proteína de fusão GST-Central+C-terminal da NifA.

A fração insolúvel do extrato livre de células contém a proteína de interesse (Glutathione-S-transferase-Central+C-terminal). Visando solubilizar a proteína de fusão esta fração foi submetida a agentes desnaturantes nas proporções de 1:1 e 4:1 (v/v) (porção insolúvel: agente desnaturante): uréia 0,5mol/L a 6,0mols/L (GOVEZENSKY *et al.*, 1994); guanidina 0,5mol/L a 6mols/L (MORJANA *et al.*, 1993); sarcosil 0,25% (FRANGIONI & NEEL, 1993), tween-20 2%; SDS 0,03% e 1%; NP-40 2%; triton-X100 1% (FRANGIONI & NEEL, 1993). Foram também utilizadas combinações da uréia com os demais agentes desnaturantes.

Diferentes tempos de tratamento (1h a 12h) em gelo, com os agentes desnaturantes, foram testados. Após o tratamento as amostras foram centrifugadas a 13000xg por 10 minutos.

As amostras tratadas com uréia 6mols/L foram dialisadas contra 3% tritonX100 em tampão 50mmols/L Tris-HCl pH7,5, 100mmols/L KCl e 1mmol/L DTT de modo a diluir a concentração de uréia para aproximadamente 47mmols/L. As amostras dialisadas foram centrifugadas a 13000xg por 10 minutos e o precipitado ressuspenso em tampão (100mmols/L KCL, 50mmols/L Tris-HCl pH 7,5).

O grau de solubilização das proteínas foi determinado através da eletroforese em géis de poliacrilamida/SDS (LaemmLi, 1970).

3.11. Purificação da Proteína GST-Central+C-terminal por cromatografia de afinidade em resina GSH-Sepharose.

O sobrenadante após diálise (item 3.10) foi adicionado a 30 μ L de uma suspensão 1:1 de resina GSH-Sepharose em tampão 50mmols/L de Tris-Cl (pH8,0), mantendo a mistura no gelo por cerca de 30 minutos. A mistura foi então centrifugada por 5 minutos a 13000xg a 4°C. A resina foi então lavada com PBS (140mmols/L NaCl, 0,27mmols/L KCl, 0,101mmol/L Na₂HPO₄, 0,18mmol/L KH₂PO₄ pH7,3) cinco vezes. As proteínas adsorvidas na resina foram eluídas com 40 μ L de 10mmols/L glutatona reduzida em 50mmols/L de Tris-Cl (pH8,0). Após 40 minutos no gelo, a suspensão foi centrifugada a 13000xg por 2 minutos. As proteínas não adsorvidas pela resina e aquelas eluídas com GSH foram analisadas por SDS/PAGE. Essa purificação também foi feita por cromatografia de afinidade em coluna GSH-Sepharose.

3.12. Produção de anticorpos policlonais contra a proteína de fusão GST-Central+C-terminal da proteína NifA.

3.12.1. Obtenção de anticorpos.

A proteína utilizada para a obtenção de anticorpos foi obtida através da extração da banda de proteína de um gel preparativo (SDS-PAGE) (LAEMMLI,1970). Nesse gel, as proteínas foram coradas com CuCl_2 (LEE *et al.*,1987), acetato de sódio (HIGGINS & DAHMUS,1978) ou Comassie blue para a localização da banda de interesse. Os anticorpos foram induzidos em coelhos após 3 imunizações com a proteína de interesse. Os animais foram injetadas com aproximadamente 500 μg de proteína a intervalos de 3 semanas. Cinco dias após a terceira imunização, o sangue foi coletado (20 mL), o soro separado e armazenado a -20°C . Os anticorpos obtidos foram analisados pela técnica de “Immunoblotting” (BURNETTE,1981).

Anticorpos não específicos para a proteína de fusão e que reconheciam outras proteínas expressas pela bactéria, foram retirados através do tratamento com extrato livre de células da estirpe hospedeira XL1-Blue, transformadas com o vetor pGEX2T. Este extrato foi incubado com uma membrana de nitrocelulose por 12 horas, após esse período essa membrana foi incubada com os anticorpos em leite pelo período de 12 horas.

3.12.2. “Immunoblotting”

As amostras foram obtidas como descrito no item 3.9. Após a separação eletroforética SDS-PAGE, o gel foi equilibrado em tampão de transferência Tris (16mmols/L), glicina (30,7mmols/L), SDS (0,1% p/v) e metanol (20% v/v) por 10 minutos. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando o sistema Mini-Protean Trans-Blot da BioRad, a 4°C por 1 hora a 150mA.

A membrana foi então incubada durante a noite em TBS (50mmols/L de Tris-HCl, 150mmols/L de NaCl, 0,002% de Tween 20) e 5% de leite desnatado (Molico), a fim de bloquear sítios reativos livres da membrana. Então a membrana foi tratada com os anticorpos diluídos 1:1000 em tampão TBS-5% leite. A incubação do anticorpo com a membrana foi feita sob leve agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes, durante 5 minutos cada, com TBS. Após lavagem, a membrana foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente, sob leve agitação, com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (HRP) diluído 1:2000 em TBS-5% leite. Após incubação a membrana foi novamente lavada 3 vezes sob agitação, durante 5 minutos cada, com TBS. A detecção das proteínas, reconhecidas pelo anticorpo, foi feita através da reação da peroxidase em tampão 0,05mols/L acetato de sódio pH5,6 contendo 0,02% o-dianisidina e 0,015% de H₂O₂. Após o aparecimento das bandas a reação foi interrompida por lavagem da nitrocelulose com água.

3.13. Purificação da fração solúvel da proteína His-Tag-Central+C-terminal.

A fração solúvel da proteína His-Tag-Central+C-terminal NifA foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna HiTrap-Chelating-Ni.

A resina HiTrap Chelating-Ni⁺² foi preparada segundo o protocolo da Pharmacia e equilibrada em tampão TP2 pH8,0 (50mmols/L TrisCl pH8,0, 500mmols/L NaCl, 1mmol/L DTT) com 5% de glicerol.

Após crescimento dos transformantes BL21*p/ysS(DE3)/pRAM2*, indução, recuperação e lise das células (item 3.9), dez mililitros do sobrenadante livre de células em tampão TP2 pH8,0 com 5% de glicerol foi aplicada a uma coluna (1mL) de resina HiTrap-Chelating-Ni⁺². A coluna foi lavada com 10 volumes de 10mmols/L de imidazol TP2 pH6,3 e posteriormente com 5 volumes de TP2 pH6,3 contendo 20, 30, 40 e 50mmols/L de imidazol. A eluição da proteína de fusão foi feita em tampão TP1pH8,0 (50mmols/L TrisCl pH8,0, 100mmols/L KCl, 1mmol/L DTT) contendo 50, 100 e 250mmols/L de imidazol e 10%de glicerol. As proteínas purificadas foram estocadas em nitrogênio líquido.

Algumas purificações foram feitas em baixos níveis de oxigênio, sob uma atmosfera de nitrogênio. Nesses casos as células foram lisadas utilizando uma French Press e o lisado coletado sob um fluxo de N₂.

3.14. Ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal NifA à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

A ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal ao promotor do gene *nifB* foi determinada por retardamento de migração eletroforética em gel de poliacrilamida.

3.14.1. Marcação radioisotópica do DNA.

O DNA foi marcado com [³⁵S] como descrito por Rickwood & Hames (1990). A região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi amplificada por PCR. Os "primers" utilizados nessa reação de amplificação foram p11 (5' GTATTGATGGATTCCCCGGC 3') e p12 (5' TCCAGCAAGGTGCCTAGGC 3') complementares às regiões 2570 e 2850 do gene *nifB* (SOUZA *et al*, 1991). A reação de amplificação continha tampão 1X Gibco PCR (20mmols/L Tris-HCl pH8,4 e 50mmols/L KCl), 0,2mmols/L dNTPs, 10pmols de cada oligonucleotídeo (p11 e p12), 1,5mmols/L MgCl₂, 20ng de DNA e 1U Taq DNA polimerase (Pharmacia) em um volume final de reação de 100 µL. Os parâmetros utilizados para a reação de amplificação do DNA foram: 2 ciclos de 1 minuto a 96°C, 45 segundos a 30°C e 30 segundos a 72°C; 30 ciclos de 45 segundos a 96°C; 45 segundos a 30°C e 1 minuto a 72°C; 1 ciclo de 45 segundos a 96°C; 45 segundos a 30°C e 5 minutos a 72°C. Após amplificação, a solução foi extraída com 1 volume de clorofórmio, precipitado com 3 volumes de etanol,

lavado com etanol 80% e ressuspendido em 45µL de H₂O. Para a determinação do sucesso da amplificação foram feitas eletroforeses em agarose 1% utilizando tampão TAE 1X (0,04M Tris-Acetato e 0.001M EDTA). O cálculo de concentração de DNA foi feito a partir da absorção em 260nm; uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 50µg/mL de DNA fita dupla (SAMBROOK *et al.*, 1989).

O fragmento de DNA amplificado foi marcado no terminal 3' com [³⁵S] utilizando a enzima T4 DNA polimerase. A reação de marcação do DNA continha 1µg de DNA, 10mmols/L Tris-acetato pH7,5, 10mmols/L de acetato de magnésio e 50mmols/L de acetato de potássio, BSA 10mg/mL e 1U de T4 DNA polimerase, o volume final da reação de 40µl. A reação foi incubada a 30°C por 5 minutos, sendo adicionado 12,5µCi de [³⁵S]αdATP (12,5mCi/mL). Após 5 minutos a temperatura ambiente 100µmols/L de dGTP, dCTP, dTTP foram adicionados, seguido de incubação a 30°C por 30 minutos quando então 100µmols/L de dATP foram adicionados.

3.14.2. Marcação radioisotópica do DNA com [³²P].

Para a marcação do DNA com [³²P] foram utilizados “primers” marcados com esse elemento. Os primers p11 e p12 (20pmols) foram marcados utilizando 10U de enzima T4 Polinucleotídeo Kinase (Gibco), tampão Forward Buffer - Gibco (70mmols/L Tris-HCl pH 7,6, 10mmols/L MgCl₂, 100mmols/L KCl e 1mmol/L 2-mercaptoethanol) e de 10 µCi de [³²P]γATP

(10mCi/mL) e incubação por 40 minutos a 37°C. A região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi então amplificada utilizando tampão 1X Gibco PCR (20mmols/L Tris-HCl pH8,4 e 50mmols/L KCl), 0,2mmols/L dNTPs, 2pmols de cada oligonucleotídeo marcado (p11 e p12), 1,5mmols/L MgCl₂, 20ng de DNA e 1U Taq DNA polimerase (Pharmacia) em um volume final de reação de 100 µL. Os parâmetros utilizados para a reação de amplificação do DNA foram: 2 ciclos de 1 minuto a 96°C, 45 segundos a 30°C e 30 segundos a 72°C; 30 ciclos de 45 segundos a 96°C; 45 segundos a 40°C e 1 minuto a 72°C; 1 ciclo de 45 segundos a 96°C; 45 segundos a 40°C e 5 minutos a 72°C.

3.14.3. Ligação da proteína His-Tag-Central-C-terminal NifA a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

O ensaio de ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* foi baseado no método de Rickwood & Hames (1990). As reações de ligação continham 0,06pmol de DNA, tampão de ligação (10mmols/L Tris-Acetato pH8,0, 8mmols/L MgCl₂, 10mmols/L acetato de potássio, 1mmols/L DTT e PEG 8000 3,5% (p/v)), concentrações variadas de proteína (0 a 1,8pmol), de DNA de timo de bezerro (10ng a 2µg) ou DNA homólogo não marcado (0,2pmol a 2pmol). O volume final de reação foi de 15µL ou 20µL, a incubação foi feita durante 2 minutos a temperatura ambiente e após esse período foram acrescentados 5 µl de ficol 30%.

3.14.4. Determinação do retardamento da banda de DNA em gel de poliacrilamida.

A análise da ligação da proteína ao DNA foi feita através do retardamento da banda de DNA em gel de poliacrilamida 5% ou 4% (RICKWOOD & HAMES, 1990) em tampão TAE 1X com 8mmols/L de $MgCl_2$. A corrida foi feita a 60V por aproximadamente 2hs a 4°C. Após a corrida, o gel foi seco e exposto contra um filme de raio X (Kodak-OMAT-X). O autoradiograma foi obtido após 12 horas de exposição.

3.15. Ativação de transcrição *in vivo*.

Os plasmídeos utilizados nesse experimento (pRT22 (*nifH::lacZ*), derivados do pET28a), foram introduzidos na estirpe de JM109(DE3).

Pré-inóculos foram crescidos em meio mínimo NFDM contendo fosfato 5%, NH_4Cl 20mmols/L, LB 5%, ácido nalidíxico 5 μ g/mL (JM109(DE3)), canamicina 50 μ g/mL (vetor pET28a) e cloranfenicol 30 μ g/mL (vetor pRT22), durante a noite a 30°C. Depois de determinada a DO_{600} , a cultura foi diluída para a DO_{600} 0,13 em um volume final de 3mL de meio mínimo NFDM acrescido de fosfato 5%, LB 5%, tiamina 5 μ g/mL, antibióticos nas

mesmas proporções anteriores e IPTG para concentração final de 0,5mmols/L. Alguns frascos continham 20mmols/L de NH_4Cl . Um frasco com amônia e outro sem foram submetidos ao crescimento na ausência de O_2 , sob uma atmosfera de N_2 . Todas as amostras foram incubadas por 8h a 30°C . Após a incubação, 100 μL das células foram testadas para analisar a atividade de β -galactosidase.

3.15.1. Atividade de β -galactosidase

Essa análise foi feita segundo Miller (1990). Em um tubo de ensaio foram adicionados 900 μL de tampão Z (Na_2HPO_4 60mmols/L, NaH_2PO_4 40mmols/L, KCl 10mmols/L, MgSO_4 1mmols/L, β -mercaptoetanol 50mmols/L e SDS 0,1%) e 25 μL de clorofórmio e 100 μL da cultura de bactérias. Após agitação em vortex, a mistura foi incubada a 30°C durante 5-10 minutos. Após este período foram adicionados à mistura, 200 μL de solução de 20mg/L o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG). Após 50 minutos a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de Na_2CO_3 1mol/L, sendo então feitas as leituras de absorbância a 420nm (o-nitrofenol), 550nm (turbidez da mistura) e 600nm (densidade celular).

Os cálculos de atividade foram feitos segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade de } \beta\text{-Gal} = \frac{1000 (\text{DO}_{420} - 1,75 \times \text{DO}_{550})}{t \times V \times \text{DO}_{600}}$$

t = tempo de incubação (minutos)

V = volume de células utilizadas (mL)

D.O.= Absorbância no comprimento de onda indicado

A atividade de β -Gal é expressa em unidades Miller. Uma unidade Miller é definida como 1nmol de *o*-nitrofenol produzido por minuto por miligramas de proteína a 30°C (MILLER,1990).

Todas as determinações de β -galactosidase foram feitas em duplicata.

3.16. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Esse método colorimétrico é baseado na ligação do Comassie Brilliant Blue G-250 com a proteína (BRADFORD,1976). A reação se completa em aproximadamente 2 minutos e permanece estável durante 1 hora. O sistema de reação continha 1mL do corante (solução de Bradford- Comassie Brilliant Blue G-250 (100mg/L), etanol 95% e ácido fosfórico 85%) e 100 μ L da amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595nm determinada. A curva padrão foi feita utilizando a albumina de soro bovina (BSA) como referência (padrão), preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. A sensibilidade desse método é de 1 a 10 μ g de proteína.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão das proteínas de fusão GST-N-terminal (pGLS1) e GST-Central+C-terminal (pGLS2) de NifA de *H.seropedicae* em *E. coli*.

Os plasmídeos pGEX2T (Pharmacia), pGLS1 e pGLS2 (Leda S. Chubatsu, resultados não publicados) foram introduzidos separadamente na estirpe XL1-Blue de *E. coli*. Após o crescimento, indução (com IPTG) e lise celular as proteínas foram analisadas em um gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Comparando as proteínas expressas pelas células contendo as construções pGLS1 e pGLS2 com aquelas expressas pelas células transformadas com o vetor pGEX2T (Figura 4). Observamos que na porção insolúvel da linha pGLS1 existe uma banda com taxa de migração de aproximadamente 48 kDa e na porção insolúvel da linha pGLS2 uma banda de aproximadamente 63 kDa, ausentes na porção insolúvel da linha pGEX2T. Essas proteínas possuem massas molares próximas as calculadas (Tabela I). Esses dados mostram que as proteínas de fusão estão sendo superexpressas, porém se encontram na porção insolúvel do extrato celular. Esse fato mostra também que a proteína NifA de *H. seropedicae* comporta-se de forma semelhante as outras proteínas homólogas quando superexpressas em *E. coli* (FISCHER, 1994).

Ensaio variando a concentração de IPTG de 0,1mmols/L até 1mmol/L, a temperatura de indução a 25°C e a 30°C e o tempo de indução de 30 minutos a 4 horas foram realizados,

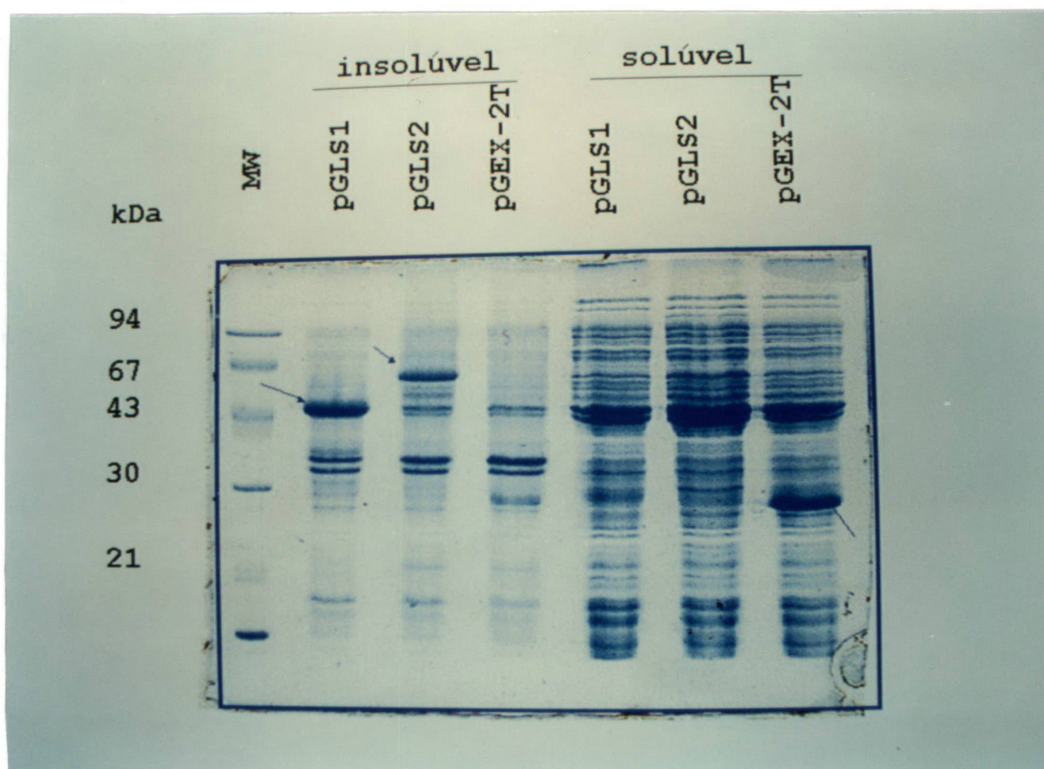


Figura 4: Padrão eletroforético das proteínas expressas pelos transformantes XLI-Blue (pGLS1) e XLI-Blue (pGLS2) e XLI-Blue (pGEX2T).

As células XLIBLue transformadas com as construções pGLS1, pGLS2 e pGEX2T foram induzidas conforme descrito em Material e Métodos (item 3.9). As proteínas expressas foram analisadas em um gel de poliacrilamida 12% com SDS.

As flechas indicam as proteínas superexpressas: GST (pGEX2T), GST-N-terminal (pGLS1) e a GST-Central-C-terminal (pGLS2). Estão indicadas as frações sóluvel e insolúvel do extrato celular. MW indica padrão de massa molecular. As proteínas foram coradas com Coomassie blue.

Tabela I – Plasmídeos e produtos após indução

Plasmídeos	Produtos dos genes de interesse	Massa molecular (kDa)
pNH11	proteína NifA de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	58,4
pDK7	proteína NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	59
pGLS1	Proteína de fusão GST-N-terminal da NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	48
pGLS2	Proteína de fusão GST-Central+C-terminal da NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	63
pRAM1	Proteína de fusão His-Tag-NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	63
pRAM2	His-Tag-Central+C-terminal da NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	41
pRAM3	His-Tag-N-terminal da NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .	25

Nesta tabela são indicados os vetores de expressão contendo as sequências codificadoras para a proteína NifA e seus domínios modulares utilizados neste trabalho. A massa molecular foi calculada a partir da sequência de aminoácidos.

visando encontrar condições onde a proteína se apresentasse na porção solúvel, no entanto, isso não foi observado em nenhuma das condições testadas.

4.2. Solubilização da proteína de fusão GST-Central+C-terminal.

O caráter insolúvel da proteína de fusão GST-Central+C-terminal e da proteína GST-N-terminal trouxe dificuldades para os trabalhos de purificação e ensaios de atividade *in vitro* e a por cromatografia de afinidade em uma resina GSH-Sepharose. Além do fato que, se as proteínas estão presentes na fração insolúvel, elas podem não estar na conformação correta formando agregados proteicos, impedindo a sua atividade *in vitro*. Devido a isso, foram realizados ensaios a fim de solubilizar o material presente na fração insolúvel do extrato celular.

Os ensaios de solubilização foram concentrados na proteína de fusão GST-Central+C-terminal porque esta proteína apresenta os domínios envolvidos na formação do complexo aberto de transcrição e na ligação ao DNA. É preciso salientar que essas duas funções já foram mostradas na proteína NifA de *K. pneumoniae* (LEE *et al.*, 1993 e BERGER *et al.*, 1994), e devido ao fato desses domínios serem muito conservados, entre as duas proteínas, é esperado que em *H. seropedicae* eles apresentem a mesma função.

O agente que mostrou melhores resultados na solubilização da proteína de fusão foi a uréia, embora os outros agentes também tenham sido capazes de solubilizar uma porção considerável da proteína (dados não apresentados).

O efeito da uréia na solubilização da proteína GST-Central+C-terminal é mostrada na figura 5. Essa solubilização foi proporcional ao aumento de concentração de uréia, sendo a concentração de 6mols/L a mais eficiente. É preciso ressaltar, como é demonstrado nessa figura, que outras proteínas são solubilizadas também.

4.3. Purificação da Proteína de fusão GST- Central + C- terminal.

Embora a concentração de 6mols/L de uréia tenha solubilizado a maior parte da proteína de interesse, a presença de uréia poderia impedir a realização de ensaios de atividade *in vitro*, já que a proteína não está em uma conformação adequada devido à presença do agente desnaturante. Outro ponto é que a cromatografia por afinidade nestas condições também seria prejudicada devido a interação GST-GSH depender de uma conformação adequada da proteína de fusão. Devido a isso, antes da amostra ser cromatografada foram feitas várias diálises tentando encontrar uma condição na qual a proteína de fusão ainda permanecesse na fração solúvel e com capacidade de se ligar na resina. No experimento mostrado na figura 6, as amostras solubilizadas em uréia 6mols/L foram dialisadas contra tritonX100 3%, por aproximadamente 12 horas, até uma concentração teórica de 47mmols/L de uréia, sendo então submetidas à cromatografia por afinidade numa resina GSH-Sepharose.

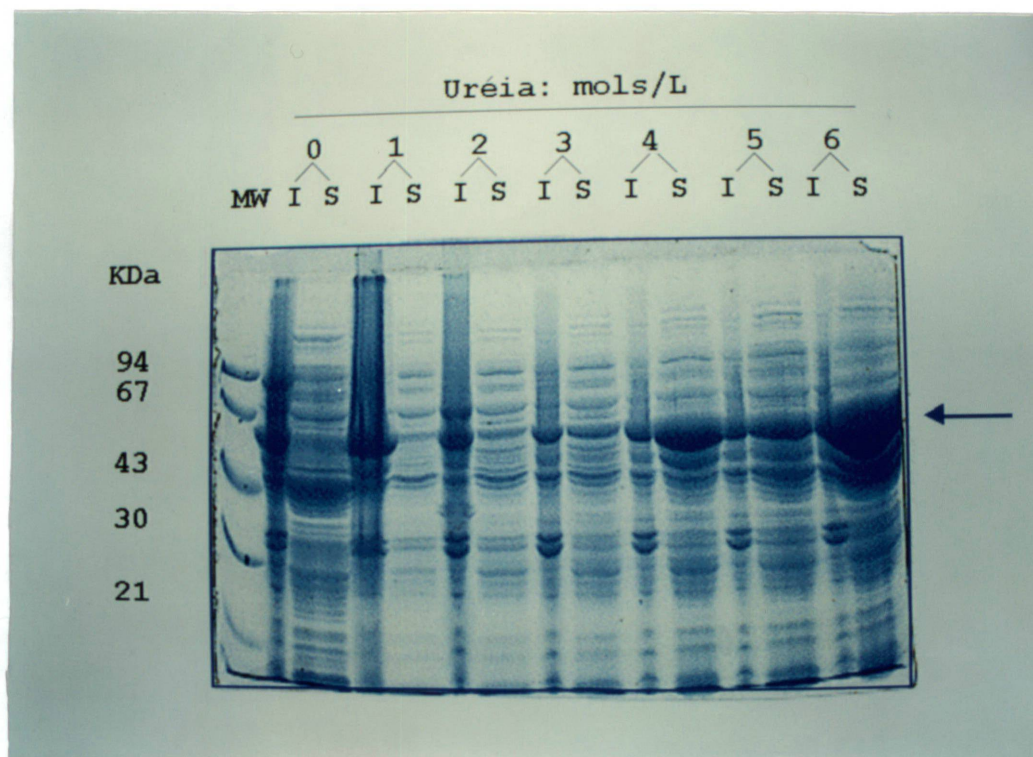


Figura 5: Ensaio de solubilização da proteína GST-Central+C-terminal com uréia.

O extrato celular foi tratado durante 2hs nas concentrações indicadas de uréia, conforme descrito em Material e Métodos (item 3.10). Após tratamento, as frações insolúvel (I) e solúvel (S), foram analisadas em gel 10% de poliacrilamida na presença de SDS como descrito em Materiais e Métodos. MW indica padrão de massa molecular. As proteínas foram coradas com Coomassie blue . A flecha indica a posição da proteína GST-Central+C-terminal.

É possível notar que após diálise aproximadamente 50% do material solubilizado permaneceu no sobrenadante e o restante voltou a fazer parte da porção insolúvel. O material ainda solúvel foi aplicado numa coluna GSH-Sepharose e cromatografado conforme descrito em Material e Métodos. Esse sistema foi o que apresentou melhor resultado. Embora comparando-se as linhas do material não adsorvido na resina com o que foi adsorvido (respectivamente, linhas 4 e 5), nota-se que pouca proteína de fusão foi adsorvida. Entretanto, o material eluído com GSH apresenta uma boa taxa de purificação, já que a maior parte das proteínas contaminantes foi eliminada nessa cromatografia. Outro aspecto é que, embora a proteína de fusão tenha sofrido desnaturação em 6mols/L de uréia, após o processo de renaturação uma parte da proteína apresentou capacidade de se ligar à resina, indicando que pelo menos a porção GST da proteína de fusão voltou a ter uma conformação adequada para reconhecimento e ligação a GSH.

A proteína de fusão GST-Central+C-terminal purificada mostrou-se incapaz de se ligar à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* que possui dois sítios potenciais de ligação para a proteína NifA (SOUZA *et al.*, 1991). Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que durante a renaturação a proteína não tenha adquirido a conformação adequada para a ligação com o DNA, muito embora, nessa condição o domínio GST tenha reconhecido o seu substrato (GSH). Em vista disso, resolvemos mudar o sistema de expressão da proteína de interesse.

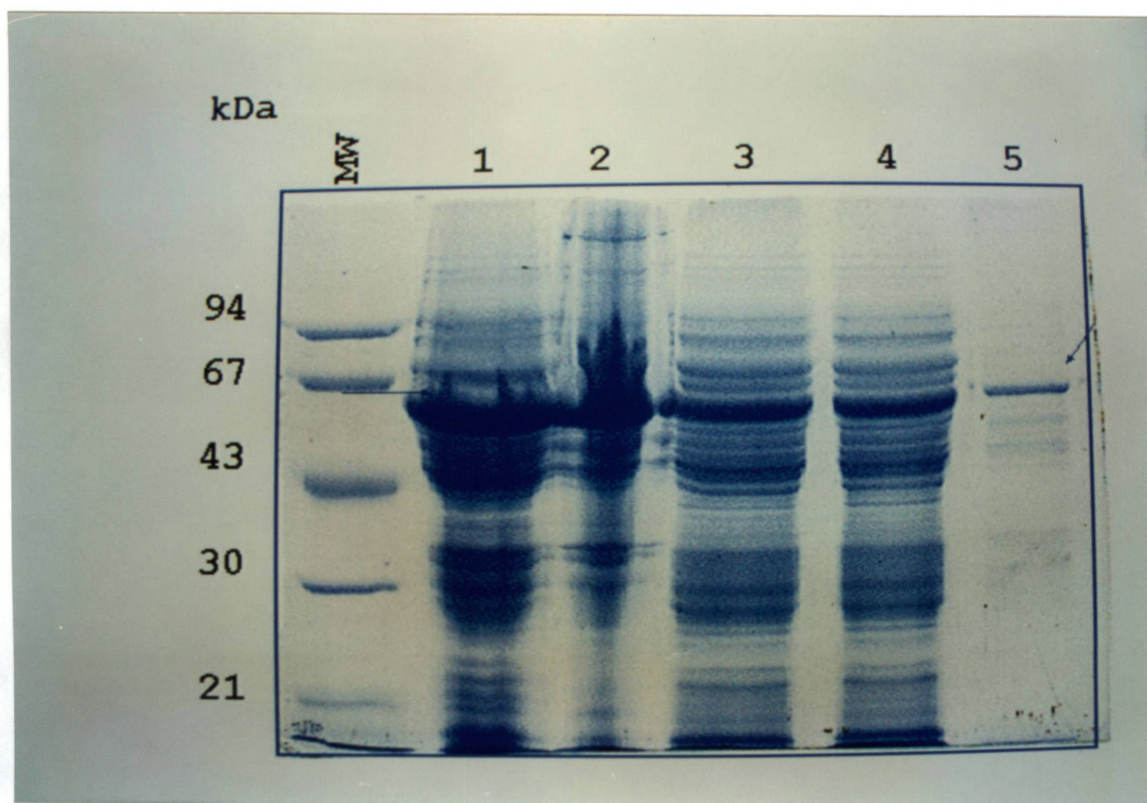


Figura 6: Purificação da proteína de fusão GST-Central+C-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*.

Eletroforese de proteínas em gel de 10% poliacrilamida-SDS das várias etapas até a cromatografia de afinidade. A fração insolúvel do lisado celular (células transformadas com pGLS2) foi incubada com uréia 6mols/L por 2 horas a 4°C, conforme descrito em Material e Métodos (item 3.11). O material solúvel (linha 1) foi dializado contra tampão 3% TritonX100. As linhas 2 e 3 mostram, respectivamente, o precipitado e o sobrenadante depois da diálise. A linha 4 mostra as proteínas que não foram adsorvidas na resina GSH-Sepharose. A linha 5 mostra as proteínas adsorvidas e eluídas com 10mM de glutathione reduzida. As flechas indicam a proteína GST-Central+C-terminal. MW indica padrão de massa molecular. As proteínas foram coradas com Coomassie blue .

4.4. Produção de Anticorpo policlonal contra a proteína de fusão GST-Central+C-terminal.

A proteína de fusão GST-Central+C-terminal foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais em coelhos, conforme descrito em Material e Métodos.

A fim de verificar o grau de reconhecimento do anticorpo obtido foi feito um "Immunoblot" utilizando vários tipos de plasmídeos recombinantes expressando a proteína NifA ou seus domínios. A figura 7A mostra uma replica do gel utilizado no "Immunoblot", aonde as proteínas foram coradas com Comassie blue. A figura 7B mostra as proteínas reconhecidas pelo anticorpo produzido. É possível constatar que o anticorpo reconhece as proteínas de fusão GST-Central+C-terminal, His-Tag-NifA, His-Tag-Central+C-terminal e a proteína NifA nativa de *H.seropedicae*, não reconhecendo o domínio N-terminal como era esperado. Entretanto, esse anticorpo parece não reconhecer também a proteína GST. Este fato não era esperado pois a proteína utilizada como antígeno foi a proteína de fusão GST-Central+C-terminal. Outro aspecto interessante e inesperado foi o fato desse anticorpo também não reconhecer a proteína NifA de *K. pneumoniae*.

Na figura 7B, na linha 2 é possível notar que o anticorpo, além de reconhecer a proteína de fusão GST-Central+C-terminal, reconhece também uma banda que está localizada logo abaixo da proteína de fusão, essa banda não aparece nos controles, indicando assim que

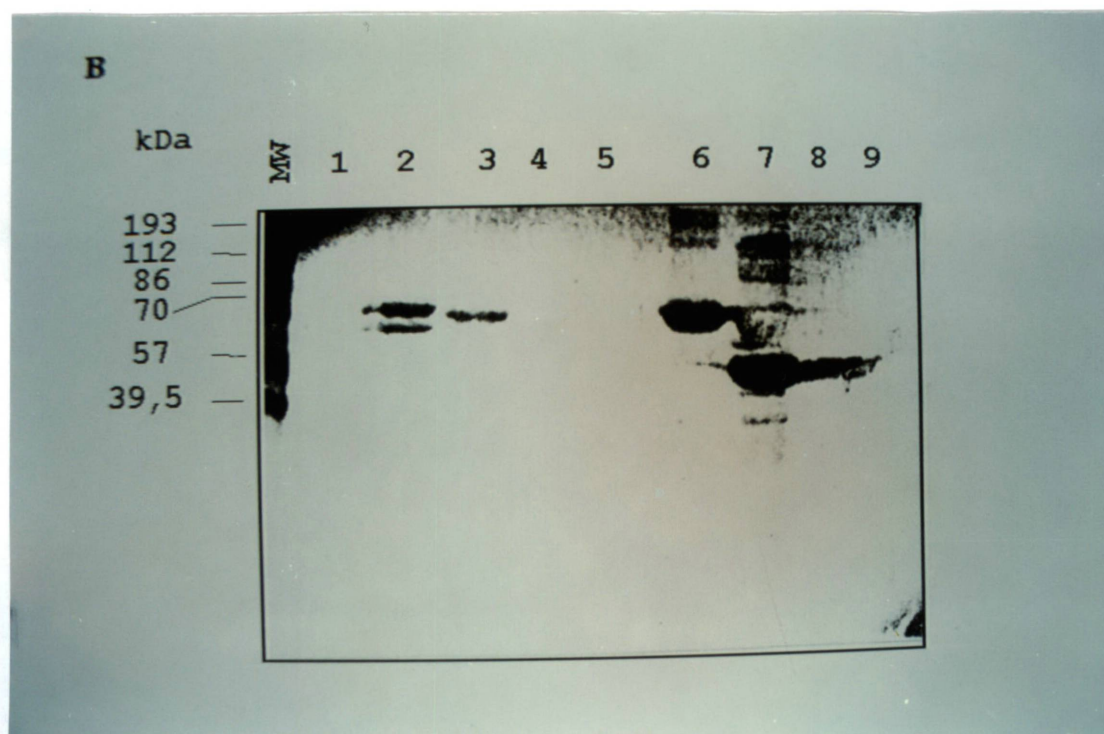
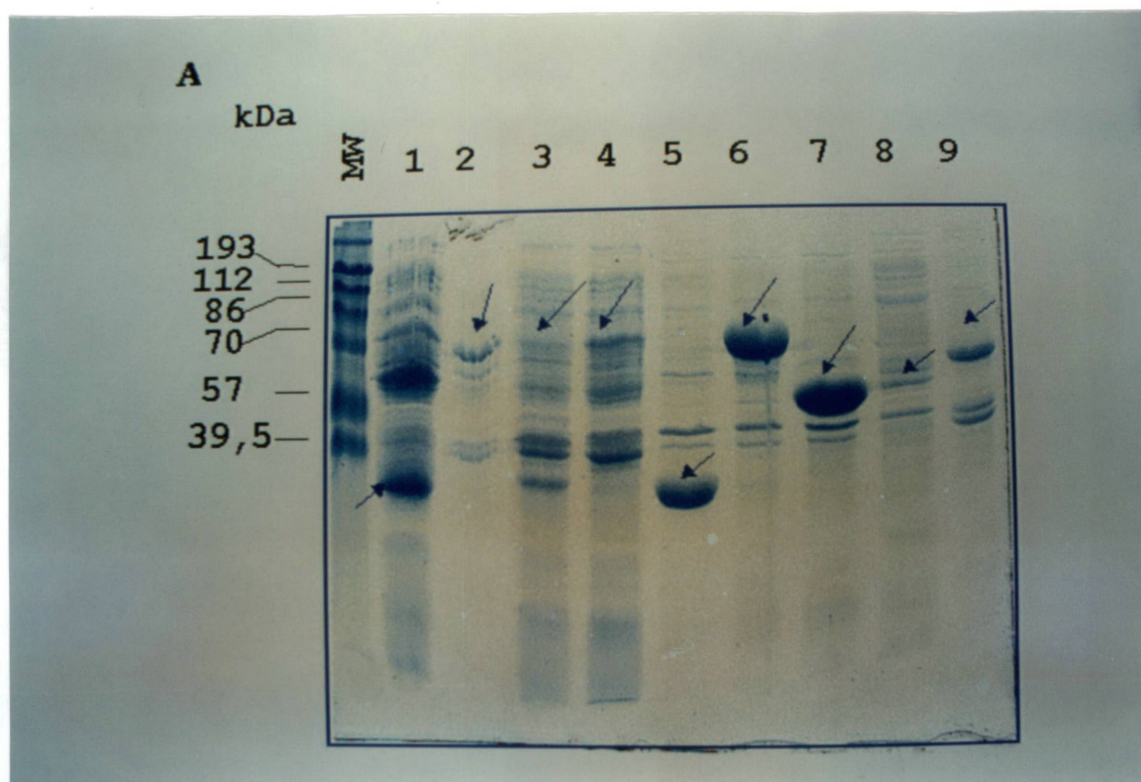


Figura 7: Análise de reconhecimento de anti soro anti proteína de fusão GST-Central+C-terminal.

A figura A mostra os extratos celulares, contendo as proteínas superexpressas, que foram eletroforizados em gel de 10% poliacrilamida-SDS e coradas com Coomassie blue. A figura B mostra o "Immunoblot" obtido utilizando anticorpo policlonal contra a proteína de fusão GST-Central+C-terminal. A detecção foi feita utilizando anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase e reação com o-dianisidina conforme descrito em Material e Métodos (item 3.12). A linha 1 mostra o extrato celular total dos transformantes pGEX2T (proteína GST); linha 2: extrato celular total dos transformantes pGLS2 (GST-Central+C-terminal); linha 3: extrato celular total dos transformantes pDK7 (NifA nativa de *H. seropedicae*); linha 4: extrato celular total dos transformantes pNH11 (NifA nativa de *K. pneumoniae*); linha 5: fração insolúvel (f.i.) do lisado celular dos transformantes pRAM3 (His-Tag-N-terminal); linha 6: f. i. pRAM1 (His-Tag-NifA); linha 7: f. i. pRAM2 (His-Tag-Central+C-terminal); linha 8: fração solúvel pRAM2; linha 9: extrato celular total dos transformantes pGLS1 (GST-N-terminal). A expressão das proteínas foi induzida com 0,5mM IPTG. As flechas indicam as proteínas superexpressas. MW indica padrão de massa molecular.

ela só é reconhecida nas células que expressam esta proteína de fusão. Essa banda pode ser a proteína de fusão degradada por alguma protease ou talvez produto de uma interrupção da síntese de proteínas. Nas linhas 6 e 7 também aparecem algumas outras bandas reconhecidas pelo antisoro. Embora, menos intensas, essas bandas indicam que, nesses extratos, o antisoro possa estar reconhecendo alguma outra proteína. É preciso salientar que embora este anticorpo tenha sido parcialmente purificado, o mesmo pode ainda conter anticorpos não específicos para os domínios Central e C-terminal da proteína NifA.

Para que esse anticorpo possa ser utilizado em ensaios de interação da proteína NifA com outras proteínas em *H. seropedicae* será necessário uma melhor purificação deste anticorpo.

4.5. Construção de plasmídeos recombinantes contendo sequências codificadoras para a proteína NifA, o domínio N-terminal e domínios Central+C-terminal da NifA.

Uma vez que a proteína de fusão GST-Central+C-terminal não apresentou atividade de ligação ao DNA *in vitro* e como a porção GST poderia estar interferindo nesta ligação, foi decidido mudar a estratégia de expressão da proteína NifA e seus domínios. O vetor de expressão utilizado então foi o pET28a que origina uma proteína de fusão com um oligopeptídeo de 24 aminoácidos contendo seis resíduos de histidina em sequência ligados à proteína de interesse. Essa proteína de fusão pode ser purificada utilizando uma resina

contendo metais como, por exemplo, níquel. O sistema é baseado na complexação dos resíduos de histidina da proteína ao metal presente na resina. Devido a proximidade das histidinas na proteína de fusão, a complexação ao metal torna-se mais eficiente.

O fragmento *SacI/HindIII* de 2,1 Kb, que corresponde a sequência de DNA que codifica para a proteína NifA, foi removido do plasmídeo pEMS130 (SOUZA *et al.*, 1991) e utilizado como DNA molde para a amplificação das regiões de interesse. A sequência dos “primers” utilizados é apresentada na figura 8, assim como a sequência codificadora para NifA. Os oligonucleotídeos utilizados possuem um sítio de restrição para a enzima de restrição *BamHI* introduzido a fim de facilitar a subclonagem no vetor de expressão. Os fragmentos amplificados que codificam para a proteína NifA, para o domínio N-terminal e para os domínios Central+C-terminal foram digeridos com a enzima *BamHI* e subclonados no vetor pET28a. Essas subclonagens deram origem aos plasmídeos pRAM (dados não mostrados). Essas construções estão apresentadas na tabela I, juntamente com outras construções utilizadas nesse trabalho.

4.6. Expressão das proteínas His-Tag-NifA e His-Tag-Central+C-terminal de *H. seropedicae* em *E. coli* estirpe BL21(DE3)*pLysS*.

Para verificar a expressão das proteínas de fusão foram utilizados o plasmídeo pRAM1 que codifica para a proteína de fusão com a proteína NifA e o plasmídeo pRAM2 que codifica a proteína de fusão com os domínios Central+C-terminal.

1

AGTATTACGTTAGGAGAGTCAAGATGGCCACTATTCTCGACGACCGCAGTGTGAATTTAGAACTCGTAACGATTT
 ACGAGATCAGCAAGATATTGGGTTCATCGCTGGATCTATCCAAGACCTTGCGCGAAGTCCTCAACGTCCT
 CTCCGCCCACCTGGAAACGAAACGGGTATTGCTGAGTCTGATGCAGGACTCCGGTGAATTGCAACTGGTC
 AGCGCCATCGGCCTGAGTTACGAAGAATTCAGAGTGGCAGATACCGGGTCGGCGAGGGCATCACCGGC
 AAGATCTTCCAGACGGAACTCCCATCGTGGTGC GCGACTTGGCCCAGGAGCCGCTGTTCTGGCTCGCA
 CCAGCCCCGCGCCAGTCGCAAGACGGGGAAGTCATTTCTTTGTGGGCGTGCCGATCAAGGCTGCCCCGTA
 AATGCTGGGTGTGTTGTGCGTTTTTTCGGGATGGACAATCGCCCTCGCGTAGTGTGCGACCATGAGGTGCGC
 CTGCTGACCATGGTGGCCAACCTGATCGGACAAACCGTCCGGCTGTATCGCAGCGTAGCGGCCGAGCGCC
 AGCAGCTGCAAGAGGAAAAGCGCCAGCTGTCCCGCAACTCCAGGGCAAGTACAAGCTCGATAACGTAA
 TCGGCATTTCCAAGGCGATGCAGGAAGTGTTTCGCGCAGGTACACAGTCCGCCCCCTCGCGCTCGACCAT
 GCTGTTGCGCGGCGAGAGCGGCACCGCAAGGAAGTCATCGCGCGGCCATCCATTACCTCAGTCCGCG
 CAAGGATGGGCCATTCATCAAGGTCAACTGTGCGGCCTTGTGCGAAACCTTGCTGGAATCCGAATTGTTT
 GGCCACGAGAAGGGCGCCTTACCGGGGGCCAGGGTGAACGCAAGGGGCGTTTCGAACTCGCCCATGGC
 GGCACCTTGTTCCTCGACGAGATCGGCGAGATCTCGCCGGCCTTCCAGGCCAAGCTGCTGCGGGTATTGC
 AGGAGCGTGAATTCGAGCGGGTCGGTGGGTGCGGTTTCGATCAAGGTGGACGTGCGTCTGGTCACCGCCA
 CCAACCGCGACCTGGAGAAGGCCGTGGCCAAGGGCGAGTTCCGGGGCCGACCTGTATTACCGTATCAATG
 TGGTCAGCATCTTCATTCTCCGCTGCGCGAACGGCGCGAGGATATTCCCTATCTGGTGGAACTTCCTG
 GAAAAATTCGTTGTGGAGAACCAGCGCGCCATGGTGGCCATGTACCGCAGGCCATGAAGGTCATGATG
 AATTGCTACTGGCCGGGCAATGTACGGGAAGTGGAAAATTGTGTGAGCGTACTGCCACCATGATGCGCG
 GCGATCTGATCACCGAGGTGCATTTCTCCTGTGAGCAGAAACAAATGCCTGACCAAGGTCTTGCATGAACC
 CGGCCAGCAGCAACCGGTCTGTTGGTGGTGCCGCTGGAGCGCATATCCGCGCCATACGGCGCCATCTTCGCC
 GAGTGGGATGGCCAAGGACAAGCCACTGGCGCCGCGCCCCGACCTCCGAACGCGAACGTCTTATCTGG
 GCCATGGAGCAATGTGGCTGGGTGCAAGCCAAGGCAGCCCGCGCACTCAACATCTCGCCGCGCCAGATG
 GGCTATGCGCTGCAGAAATTCAATATCGAGGTCAAGAAGTTCTGAAACTCATCTGC

551

HsnifA1-5'-TAGGGATCCCATATGGCCACT-3' (Sequência em verde)

HsnifA2A-5'-AGAGGATCCTCAGAACTTCTTGACCTCG-3' (Seq. comp. a seq. em azul)

HsnifA3A-5'-ATGGATCCTCAGTTATCGAG-3' (Seq. complementar a seq. em vermelho)

HsnifA4-5'-TCGGATCCGTAATCGGC-3' (Sequência grifada em vermelho)

↓
sítio de restrição para *Bam*H1

Figura 8: Sequência do gene que codifica para a proteína NifA de *H. seropedicae*, com os primers utilizados na subclonagem (SOUZA *et al.*,1991).

Os plasmídeos recombinantes pRAM1 (linha 2) e pRAM2 (linha 4) (Figura 9) apresentam duas bandas de proteínas super expressas, não presentes nos outros extratos. Essas bandas apresentam taxa de migração correspondente a cerca de 63kDa e 41kDa, próximas aquelas calculadas para as proteínas de fusão (Tabela I). É possível observar também que as proteínas superexpressas estão presentes na sua maioria na fração insolúvel do extrato celular, semelhante ao ocorrido com a construção pGLS. Comparando a linha 1, que contém as proteínas expressas na porção solúvel pelas células transformadas como vetor pET28a, com a linha 5, que contém as proteínas expressas na porção solúvel pelas células transformadas com pRAM2, é possível notar que existe uma banda com taxa de migração de aproximadamente 41kDa presente apenas na amostra correspondente a bactéria expressando a proteína de fusão com os domínios central e C-terminal da NifA. Esse resultado mostra que embora a maior parte da proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal esteja presente na fração insolúvel do extrato celular, uma pequena fração está presente na fração solúvel.

Analisando o perfil proteico dos transformates pRAM1 nota-se uma alta taxa de expressão da proteína de fusão His-Tag-NifA, porém a quase totalidade da proteína superexpressa está presente na fração insolúvel do extrato celular.

Outras condições como concentrações de IPTG, tempo e temperatura de indução foram testadas visando favorecer a presença das proteínas de fusão na fração solúvel, porém isso não foi observado (dados não apresentados). Quando as células foram induzidas com lactose 0,5% foi possível observar uma maior quantidade da proteína His-Tag-Central+C-terminal na porção solúvel. Entretanto a lactose pareceu não exercer o mesmo efeito quanto a expressão da proteína de fusão His-Tag-NifA (dados não mostrados).

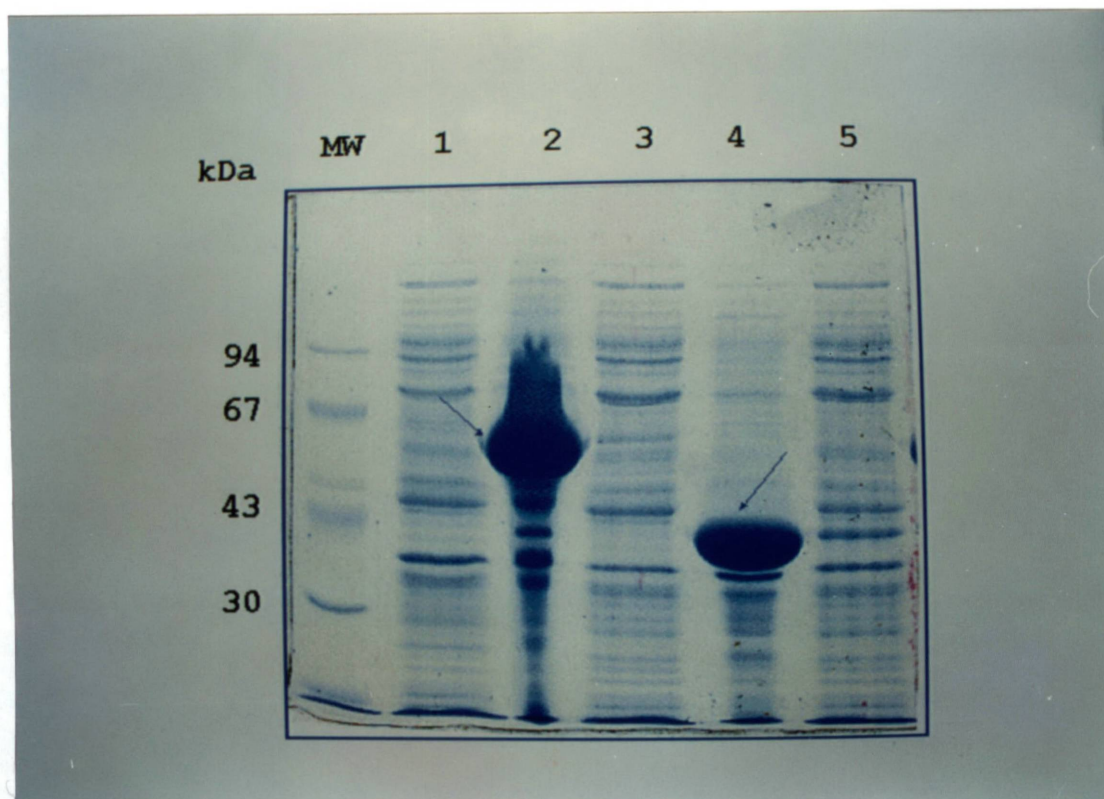


Figura 9: Análise da expressão das proteínas His-Tag-NifA (pRAM1) e His-Tag-Central+C-terminal (pRAM2).

Extrato de células BL21(DE3)*pLysS* transformadas com os plasmídeos pET28a, pRAM1 e pRAM2 foram analisadas em gel de 10% poliacrilamida-SDS conforme descrito em Material e Métodos (item 3.9). A linha 1 mostra a fração solúvel do lisado celular das células transformadas com o vetor pET28a. As linhas 2 e 3 mostram, respectivamente, o precipitado e o sobrenadante do lisado celular das células transformadas com o pRAM1 e as linhas 4 e 5 do pRAM2. As flechas indicam as proteínas superexpressas.

MW indica padrão de massa molecular. As proteínas foram coradas com Coomassie blue .

4.7. Purificação da proteína His-Tag-Central+C-terminal por cromatografia de afinidade.

A proteína His-Tag-Central+C-terminal solúvel foi purificada através de cromatografia por afinidade em coluna Hi-Trap Chelating (Pharmacia) contendo Ni^{+2} . Para a purificação da proteína His-Tag-Central+C-terminal foram testadas várias condições como: o tipo e a concentração de sal utilizado no tampão de purificação, a presença ou não de glicerol, o pH do tampão, o número de lavagens que deveriam ser feitas na coluna para proporcionar uma melhor purificação, diversas concentrações de imidazol no tampão de lavagem e eluição. De todos os protocolos testados o que proporciona a melhor purificação foi o que está descrito em Material e Métodos (item 3.13). A figura 10A apresenta algumas frações provenientes da eluição da coluna com 100mmols/L de imidazol. A fim de evidenciar a presença de contaminantes, algumas frações apresentadas em A foram "super-coradas" com prata. A figura 10B mostra o resultado obtido. É evidente que o número e a fração de contaminantes presentes é pequeno quando comparado à proteína de interesse, indicando, portanto que o método utilizado permite uma purificação eficiente da proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal.

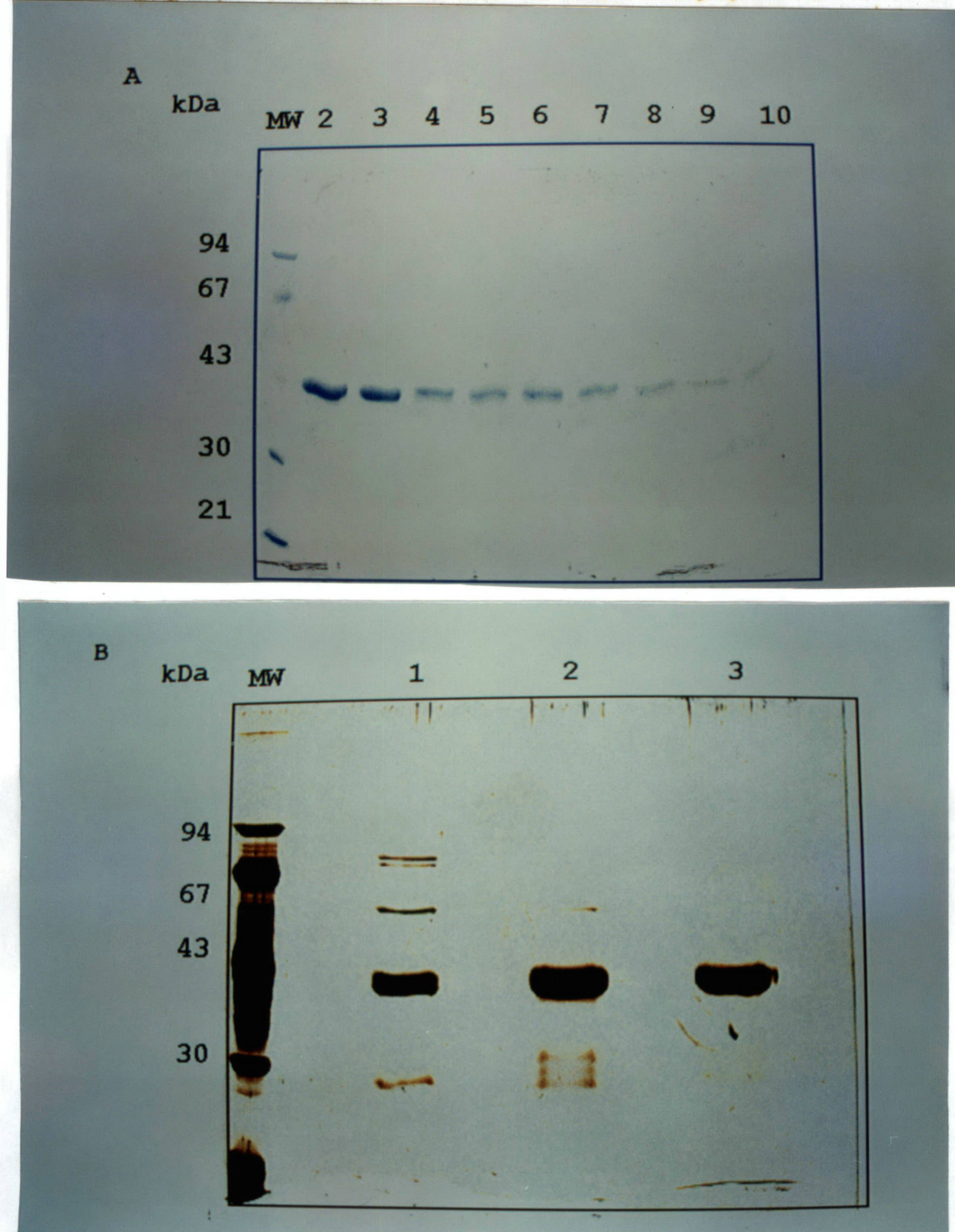


Figura 10: Purificação da proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal.

Eletroforese em gel de 10% de poliacrilamida com SDS.

A figura A apresenta o perfil proteico de frações eluídas da coluna HiTrap-Chelating- Ni^{+2} , os números de 2 a 10 correspondem a frações eluídas com 100mmols/L de imidazol, coradas com Coomassie blue.

A figura B apresenta as frações 1, 2 e 3 coradas com prata. A fração 1 não está presente na figura A. MW indica padrão de massa molecular.

4.8. Determinação da capacidade de ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal purificada ao promotor do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

A fim de verificar a capacidade da proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal de se ligar ao DNA foi utilizada a técnica de retardamento da banda de DNA em gel de poliacrilamida 5%. Essa técnica baseia-se no fato de que o fragmento de DNA apresenta uma determinada taxa de migração que é alterada quando o fragmento está ligado a proteína.

Uma peculiaridade da purificação da proteína utilizada nesses experimentos foi que durante a purificação, no momento da eluição, a proteína foi eluída em alta concentração e a mistura apresentou um aspecto turvo, precipitação. Berger e colaboradores (1993) trabalhando com a proteína NifA de *K. pneumoniae* também relataram precipitação da proteína durante a purificação. Como será possível observar nos itens posteriores, a proteína His-Tag-Central+C-terminal mostrou-se ativa.

4.8.1. Efeito da concentração de proteína na ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal à região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

Os resultados observados nesta autoradiografia mostram que a proteína His-Tag-Central+C-terminal é capaz de ligar-se ao DNA do gene *nifB* de *H. seropedicae* (Figura 11).

O retardamento foi evidente a partir de 0,15pmol de His-Tag-Central+C-terminal, indicando que nestas condições a proteína His-Tag-Central+C-terminal ligou-se ao DNA.

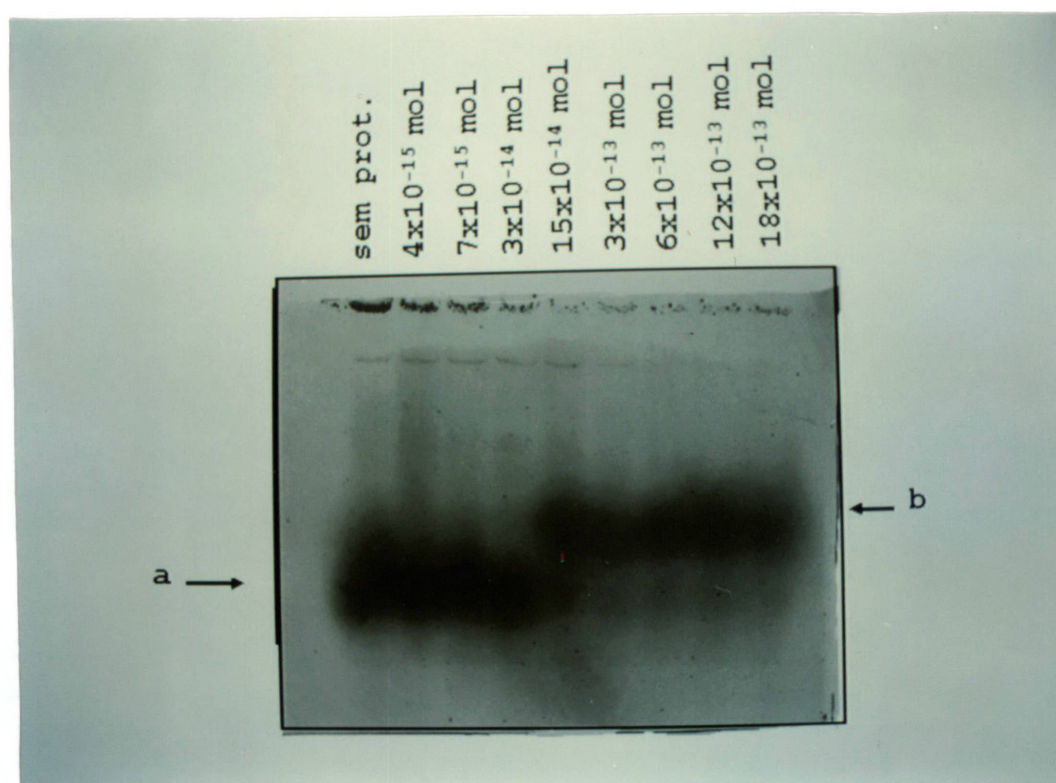


Figura 11: Ensaio de ligação da proteína solúvel His-Tag-Central+C-terminal com a região promotora do gene *nifB* de *H.seropedicae*.

A proteína solúvel His-Tag-Central+C-terminal purificada foi testada em relação a sua atividade de ligação ao DNA. Cada reação contém 12,5ng ($\sim 6 \times 10^{-14}$ mol) de DNA correspondente a região promotora do gene *nifB* (320pb) marcado com [^{35}S] e diferentes concentrações da proteína His-Tag-Central+C-terminal indicadas na figura. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 5% em tampão 1XTAE e 8mmols/L de MgCl_2 como descrito em Material e Métodos (item 3.14). A seta a indica a taxa de migração do DNA livre e a seta b mostra a taxa de migração do complexo DNA-proteína.

Considerando-se a massa da proteína presente e a quantidade de DNA utilizado, estimou-se que essa ligação ocorreu numa proporção de pelo menos 2,5:1 (em mols da proteína para DNA). Essa proporção pode indicar que o retardamento observado seja proveniente da ligação da proteína aos dois sítios de ligação presente na região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*.

4.8.2. Efeito da concentração de DNA de tимо sobre a ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal a região promotora do gene *nifB* de *H.seropedicae* marcada radioativamente.

Neste ensaio foi utilizado DNA de tимо de bezerro (não marcado radioativamente) em diferentes concentrações a fim de verificar a especificidade da ligação da proteína à região promotora do gene *nifB*. Foram feitas nove reações de ligação, contendo 0,06pmol de DNA marcado, 0,6pmol de proteína e diferentes concentrações de DNA de tимо (de 10ng a 2μg) (Figura 12). É possível observar que quando a proteína His-Tag-Central+C-terminal está presente, ocorre retardamento na migração do DNA, mesmo em altas concentrações de DNA de tимо. Esses resultados mostram que a ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal com a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* é específica, uma vez que o DNA de tимо não causou diferença na taxa de migração do DNA marcado.

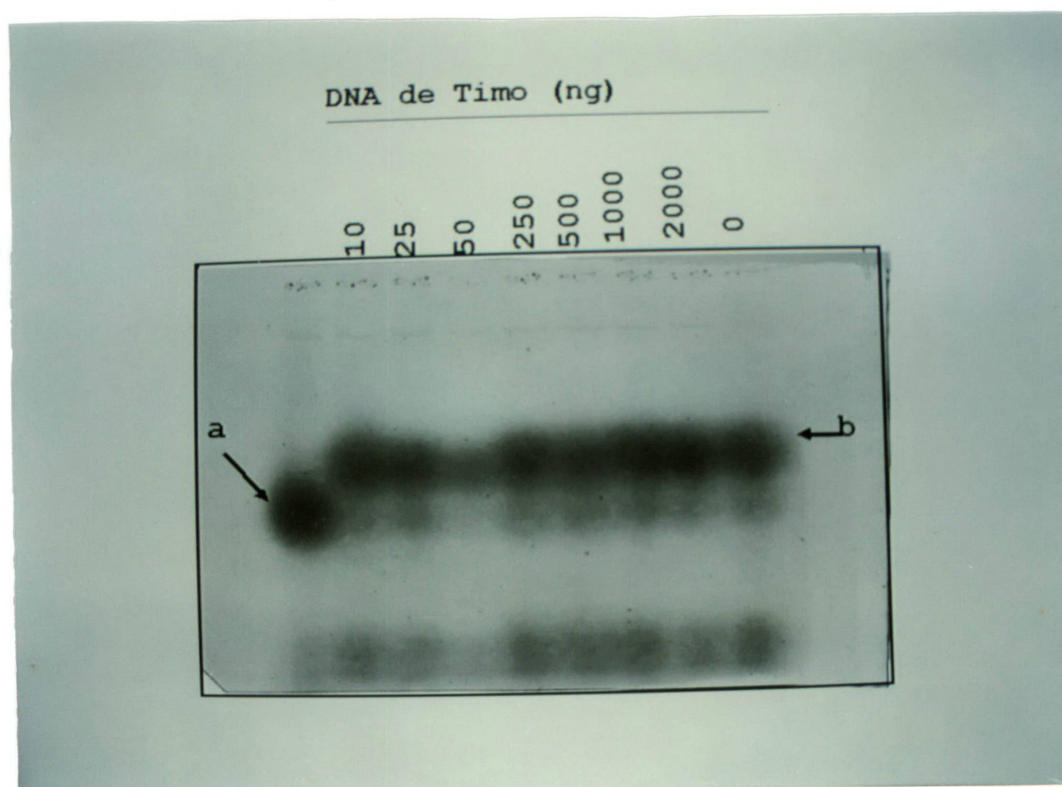


Figura 12: Ensaio de ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal com a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* na presença de DNA de timo.

Cada reação continha 12,5ng ($\sim 6 \times 10^{-14}$ mol) de DNA correspondente a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* (320pb) marcado com [^{35}S], 25ng ($\sim 6 \times 10^{-13}$ mol) da proteína purificada His-Tag-Central+C-terminal e as concentrações indicadas (em nanogramas) de DNA de timo de bezerro. As amostras foram analisadas em um gel de poliacrilamida 5% conforme descrito em Material e Métodos (item 3.14). A seta a indica a taxa de migração do DNA livre e a seta b mostra a taxa de migração do DNA ligado a proteína.

4.8.3. Efeito da concentração de DNA homólogo sobre a ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal a região promotora do gene *nifB* de *H.seropedicae*.

Neste ensaio foi utilizado DNA homólogo, região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* não marcado radioativamente em diferentes concentrações a fim de verificar se o aumento de DNA homólogo não marcado provocaria o desligamento da ligação da proteína à região promotora do gene *nifB*. A proteína His-Tag-Central+C-terminal utilizada nesse experimento foi purificada em baixos níveis de oxigênio, sob uma atmosfera de nitrogênio. Foram feitas nove reações de ligação, contendo aproximadamente 0,06pmol de DNA marcado, 0,6pmol de proteína e diferentes concentrações de DNA homólogo (0,2pmol, 0,4pmol, 0,8pmol, 1,2pmol, 1,6pmol e 2,0pmol).

Novamente, foi observado o retardamento da banda de DNA pela proteína His-Tag-Central+C-terminal (Figura 13). Concentrações crescentes de DNA homólogo causaram o desaparecimento do complexo DNA-proteína, enquanto a banda correspondente ao DNA marcado livre vai aumentando de intensidade. Portanto a adição de DNA homólogo não marcado desloca a proteína do DNA marcado. Esses resultados, em conjunto, indicam que a ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal com a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* ocorre e é específica, uma vez que o DNA de timo não interfere com o complexo DNA-proteína e o DNA homólogo não marcado desfaz esse complexo.

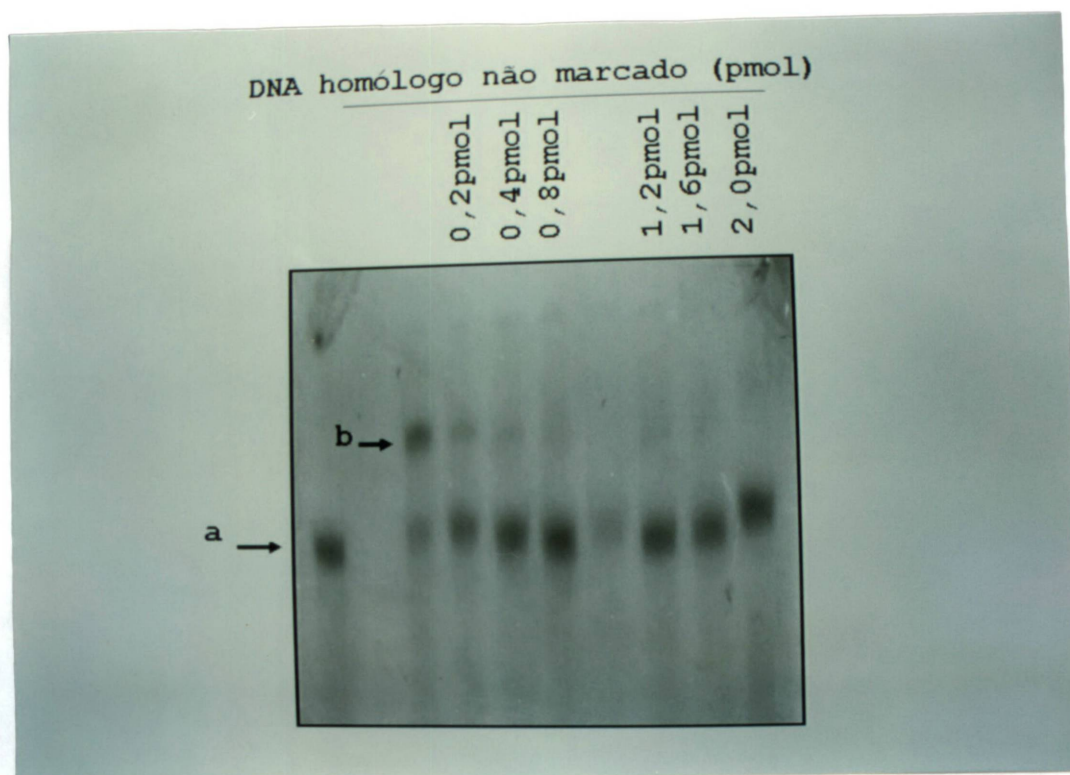


Figura 13: Ensaio de ligação da proteína His-Tag-Central+C-terminal com a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* na presença de DNA homólogo (*nifB*) não marcado.

Cada reação continha 0,06pmol de DNA correspondente a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* (320pb) marcado com [^{32}P], 0,6pmol da proteína purificada His-Tag-Central+C-terminal e as concentrações indicadas (em pmols) de DNA homólogo não marcado. As amostras foram analisadas em um gel de poliacrilamida 5% conforme descrito em Material e Métodos (item 3.14). A seta a indica a taxa de migração do DNA livre e a seta b mostra a taxa de migração do DNA ligado a proteína.

4.9. Efeito das proteínas His-Tag-NifA (pRAM1) e His-Tag-Central+C-terminal (pRAM2) sobre a expressão “in vivo” do promotor *nifH* de *K. pneumoniae*.

A atividade das proteínas His-Tag-NifA e His-Tag-Central+C-terminal como ativadora de transcrição de promotores *nif* foi avaliada pela expressão da fusão *nifH::lacZ* do plasmídeo pRT22. Nesta fusão, a expressão do gene da β -galactosidase está sob controle do promotor do gene *nifH* de *K. pneumoniae* (TULI & MERRICK, 1988). O ensaio é baseado no fato que, se as proteínas expressas são capazes de ativar a transcrição dos genes *nif*, ocorre a síntese de β -galactosidase pela fusão *nifH::lacZ*, sendo a sua atividade facilmente detectada. Uma vez que a atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* *in vivo* é sensível aos níveis de O₂ e amônia (SOUZA *et al.*, 1995b), a atividade das proteínas de fusão foram analisadas na presença ou ausência de amônia e ou oxigênio.

Os plasmídeos pET28a, pRT22, pRAM1, pRAM2 foram introduzidos na estirpe de *E. coli*, JM109(DE3). Foram analisados transformantes contendo cada um dos plasmídeos como controle para o nível basal de β -galactosidase. Os demais transformantes analisados continham o plasmídeo pRT22 que apresenta a fusão *nifH::lacZ* e um dos outros três plasmídeos (pET28a, pRAM1 ou pRAM2). Analisando os dados apresentados na figura 14 é possível verificar que os controles apresentam uma baixa atividade de β -galactosidase, sendo que, em alguns casos, essa atividade não é detectada. Os dados mostram que somente o duplo transformantes analisados, somente o pRT22/pRAM2 apresenta atividade de β -galactosidase maior que o nível basal, indicando, portanto, que os domínios Central e C-terminal expressos

tem a capacidade de ativar a transcrição do gene *lacZ* através do promotor do *nifH* de *K. pneumoniae* em *E. coli*.

A análise dos resultados mostra que, a proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal é capaz de ativar a transcrição apenas na ausência de O₂, enquanto a amônia não exerce efeito sobre essa atividade. Dessa maneira, a proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal apresenta sensibilidade a O₂ *in vivo*, mas não a amônia. Esses dados confirmam o resultado obtido anteriormente por Souza e colaboradores (1995b) e sugerem que o domínio N-terminal, da proteína NifA, possa estar relacionado ao sensoriamento dos níveis de amônia. Quando esse domínio é deletado, como ocorre na proteína de fusão, a proteína perde a regulação pela amônia. Por outro lado, esse resultado sugere que a sensibilidade a O₂ não está relacionada ao domínio N-terminal da proteína.

Por outro lado, o transformante pRT22/pRAM1 que produz a proteína de fusão His-Tag-NifA apresentou níveis basais de β -galactosidase em qualquer das condições testadas, sendo portanto incapaz de ativar o promotor *nifH* de *K. pneumoniae* em *E. coli*. O fato da proteína His-Tag-NifA não apresentar atividade *in vivo* nas condições ensaiadas, pode indicar num primeiro momento que estamos produzindo uma proteína sem atividade. No entanto, dados obtidos anteriormente neste laboratório (SOUZA *et al.*, 1995b) mostram que quando a NifA é superexpressa em *E. coli*, ela não apresenta capacidade de ativação de transcrição nas condições do ensaio, sugerindo que em *H. seropedicae* existe algum fator que possa estar interagindo com a proteína NifA que parece não estar presente em *E. coli*.

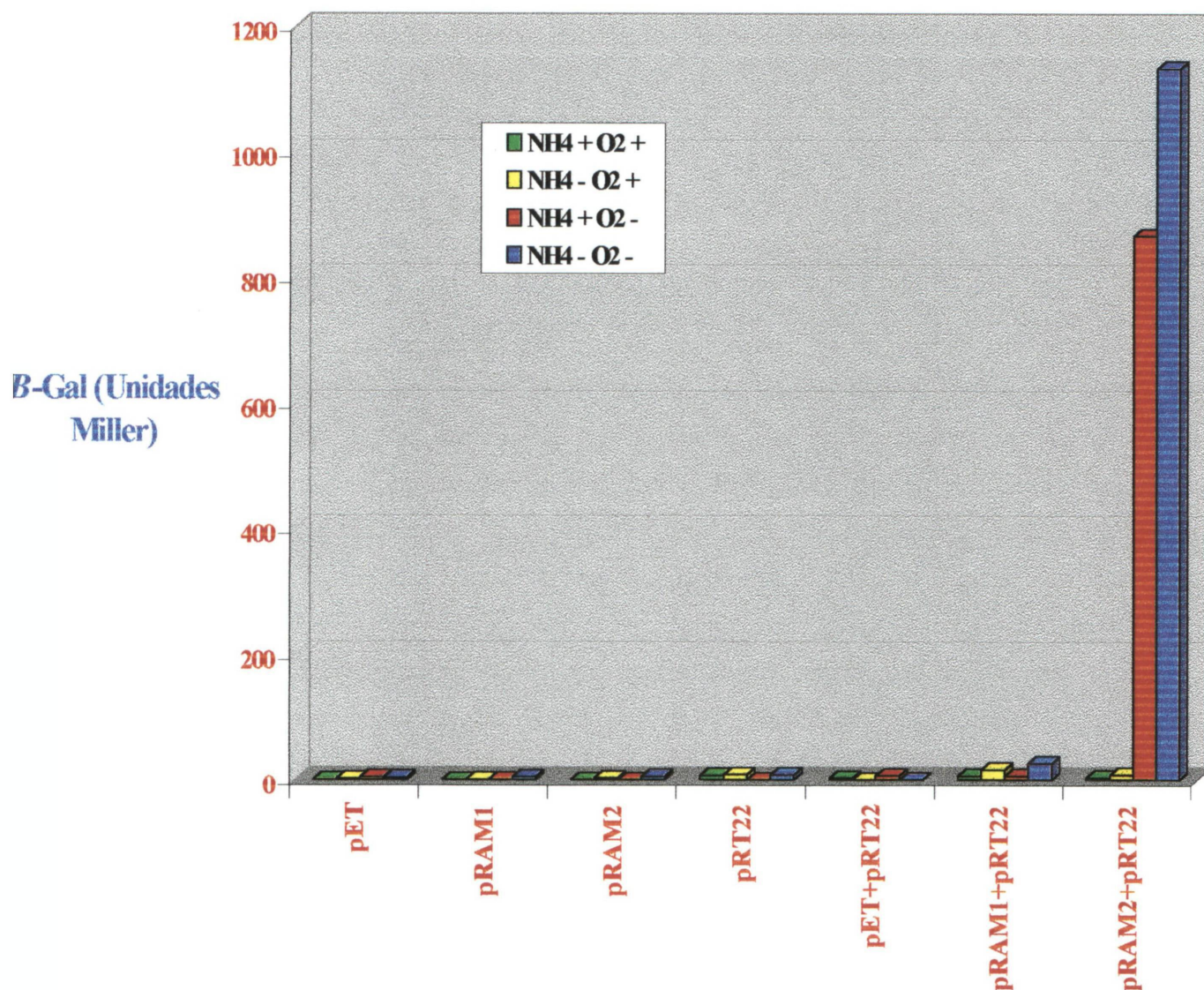


Figura 14: Ensaio de ativação da transcrição *in vivo* pelas proteínas His-Tag-NifA (pRAM1) e His-Tag-Central+C-terminal (pRAM2) do promotor *nifH* de *K. pneumoniae* em fusão *lacZ* (pRT22).

Os plasmídeos indicados foram transformados em células JM109(DE3) e o ensaio de atividade de β -galactosidase foi realizado como descrito em Material e Métodos (item 3.15).

Os dados correspondem a média de pelo menos 5 experimentos independentes com desvio padrão inferior a 10%.

5. DISCUSSÃO

A proteína NifA é o ativador específico da transcrição de genes *nif* nos diazotrofos gram-negativos. A grande dificuldade do estudo bioquímico da proteína NifA tem sido a sua insolubilidade intrínseca. A proteína NifA de *K. pneumoniae*, quando superexpressa em *E. coli* é insolúvel. Várias tentativas para solubilizar e purificar esta proteína foram feitas, mas nenhuma obteve sucesso (TULI & MERRICK, 1988 e AUSTIN *et al.*, 1990). As proteínas NifA de *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Azotobacter vinelandii* também foram superexpressas e, de maneira geral, insolúveis. Destas, a proteína NifA de *A. vinelandii* foi a que apresentou maior solubilidade (50%) e a única que pode ser parcialmente purificada na forma nativa (AUSTIN *et al.*, 1994 e FISCHER, 1994). Uma das hipóteses sugeridas a insolubilidade destas proteínas é a agregação das cadeias polipeptídicas nascentes.

Várias tentativas para aumentar a solubilidade da proteína NifA de *K. pneumoniae* foram feitas: co-expressão com a proteína NifL, como proteína de fusão NifA-proteína de ligação a maltose (MBP) e como domínios isolados ((AUSTIN *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 1993 e BEGER *et al.*, 1995). A proteína de fusão MBP-NifA foi consideravelmente mais solúvel que a proteína NifA e purificada naquela forma, porém após separação por proteólise, a proteína NifA tornou-se insolúvel e inativa (LEE *et al.*, 1993). O domínio central liberado da proteína de fusão MBP-domínio Central permaneceu solúvel e a sua atividade aumentou cerca de 30

vezes (BERGER *et al.*, 1994), enquanto que a liberação dos domínios Central+C-terminal produziu uma diminuição na sua solubilidade e atividade (BERGER *et al.*, 1995). Estes resultados sugerem que domínios da NifA quando superexpressos separadamente podem ser mais solúveis (BERGER *et al.*, 1994) e, como estes domínios provavelmente possuem funções independentes, é possível estudar suas diferentes atividades. Tendo em vista esta consideração, a proposta do nosso trabalho foi construir um plasmídeo recombinante capaz de super-expressar os domínios Central+C-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*, purificar a proteína recombinante e caracterizá-la bioquimicamente.

Inicialmente, a proteína NifA truncada de *H. seropedicae*, contendo domínios Central+C-terminal combinados, foi expressa fundida com a enzima glutational S-transferase (GST) a partir do plasmídeo pGLS1 e pGLS2. A análise do extrato celular de estirpes de *E. coli* contendo aqueles plasmídeos após indução com IPTG mostrou que a proteína de fusão foi produzida, mas estava presente apenas na fração insolúvel. Várias tentativas para solubilizar a proteína GST-Central+C-terminal foram realizadas, sendo que a uréia (6 mols/L) foi a condição mais eficaz. Após desnaturação/renaturação, aproximadamente 50% da proteína permaneceu na fração solúvel e foi capaz de adsorver em GSH-Sepharose, indicando que a porção da glutational S-transferase readquiriu uma conformação na qual foi capaz de reconhecer seu substrato. A proteína de fusão eluída com GSH foi incapaz de se ligar a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*. Este resultado sugere que o domínio Central+C-terminal da proteína de fusão não recuperou sua conformação nativa após o tratamento com uréia ou que a proteína de fusão GST-Central+C-terminal foi expressa numa forma incapaz de

reconhecer o sítio de ligação para a proteína NifA.

Anticorpos policlonais utilizando a proteína de fusão GST-Central+C-terminal como antígeno foram produzidos em coelho. Os domínios Central+C-terminal foram escolhidos, ao invés da proteína inteira ou do domínio N-terminal, porque a proteína NifA provavelmente interage com proteínas regulatórias através do seu domínio N-terminal (ARSENE *et al.*, 1996 e BENELLI, 1997). Desta maneira anticorpos produzidos contra os domínios Central+C-terminal poderiam ser utilizados em experimentos de imunoprecipitação, permitindo a identificação daquelas proteínas regulatórias.

Os anticorpos obtidos foram capazes de reconhecer os domínios Central+C-terminal e a proteína NifA nativa de *H. seropedicae* expressas em *E. coli*. Porém, estes anticorpos não reconheceram a GST. Este resultado foi inesperado, pois a proteína utilizada para a obtenção do anticorpo continha a porção GST. Isto pode indicar que a proteína utilizada estivesse em uma conformação na qual os epítomos da GST não estavam expostos ou que esta proteína seja menos imunogênica do que a porção Central+C-terminal da proteína NifA. É importante notar que a proteína que se ligou à resina GSH-Sepharose e aquela que foi injetada no coelho, não sofreram o mesmo tratamento e, portanto, podem estar em conformações diferentes.

Apesar da alta identidade (48 %) entre os domínios central e C-terminal das proteínas NifA de *H. seropedicae* e *K. pneumoniae*, os anticorpos policlonais obtidos não reconheceram a segunda, indicando que diferentes determinantes antigênicos estão expostos nestas duas proteínas.

Em virtude da proteína de fusão GST-Central+C-terminal não apresentar atividade de ligação ao DNA resolvemos utilizar outro sistema para a expressão dos domínios da proteína NifA. O novo sistema foi baseado no vetor de expressão pET28a. A proteína NifA inteira e os

domínios Central+C-terminal foram expressos como proteína de fusão com a sequência His-Tag. Ambas proteínas de fusão apresentaram um alto nível de expressão, porém somente uma pequena parte da proteína His-Tag-Central+C-terminal foi encontrada na porção solúvel do extrato livre de células.

Várias tentativas para otimizar a indução da expressão e solubilidade da proteína de fusão foram feitas e a indução com lactose (0,5%) durante 3 horas produziu a maior quantidade da proteína His-Tag-Central+C-terminal na porção solúvel. Provalmente a lactose induz a produção de proteínas que estabilizam a proteína de fusão na sua conformação solúvel. A proteína His-Tag-NifA foi insolúvel em todas as condições testadas.

A proteína His-Tag-Central+C-terminal solúvel foi purificada em uma coluna Hitrap-Ni⁺². Embora a presença da sequência His-Tag tenha o objetivo de facilitar a purificação, condições ótimas foram estabelecidas (espécie iônica e concentração, pH, presença ou ausência de DTT e glicerol) a fim de se obter um maior grau de purificação e rendimento.

Inicialmente o EDTA foi utilizado como competidor no tampão de eluição, como sugerido pelo fabricante. Embora uma boa taxa de purificação tenha sido obtida, o EDTA interferiu nos ensaios de ligação ao DNA. O imidazol passou então a ser utilizado.

A presença de glicerol nos tampões de lavagem e eluição permitiu que a proteína de fusão fosse eluída de uma maneira mais rápida porém menos pura. A lavagem da coluna foi então dividida em 2 fases: na primeira fase o tampão de eluição não continha glicerol e o gradiente de imidazol foi de 0 a 50 mmols/L. Esta etapa elimina a maior parte das proteínas contaminantes. Na segunda fase, a eluição foi efetuada num gradiente de 50 a 250 mmols/L de imidazol em tampão contendo glicerol. As condições utilizadas permitiram obter a proteína His-Tag-Central+C-terminal com um alto grau de pureza em apenas uma etapa de purificação.

Cromatografia em coluna de heparina como um segundo passo foi feita, mas não foi observada uma melhora na purificação (dados não apresentados).

A proteína His-Tag-Central+C-terminal purificada apresentou atividade de ligação a um fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*. Essa região possui dois possíveis sítios de ligação para a proteína NifA (sítios UAS) (SOUZA *et al.*, 1991). A ligação foi observada a partir de uma proporção de 2,5:1 (proteína:DNA, mol/mol), indicando uma alta afinidade da proteína NifA de *H. seropedicae* pelo promotor do gene *nifB*. A ligação ao DNA foi específica, pois mesmo quando altas concentrações de DNA de timo foram adicionadas, a proteína His-Tag-Central+C-terminal continuou ligando a região promotora do gene *nifB*. Além disto, o complexo DNA-proteína foi desfeito na presença de concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado (região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae*). Atividade da proteína de fusão foi perdida durante na estocagem e nos ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido. Este fato também foi observado para a proteína NifA de *K. pneumoniae* (Berger *et al.*, 1995). A proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal utilizada nestes experimentos formou um agregado logo após a eluição da coluna Hitrap-Ni⁺², provavelmente devido a grande concentração de proteína.

Outras preparações da proteína His-Tag-Central+C-terminal também foram obtidas, mas apresentavam uma baixa atividade de ligação a UAS. Várias tentativas foram feitas para restaurar a atividade da proteína, tais como troca dos tampões, espécie iônica e concentração, mas sem sucesso. Quando a proteína foi purificada na ausência de oxigênio, atividade da proteína voltou a ser observada, condição que passou então a ser utilizada na purificação da proteína de fusão.

A proteína NifA de *H. seropedicae* é incapaz de ativar a expressão de genes *nif* sob altas tensões de O₂ *in vivo* (figura 14). A sensibilidade ao O₂ pode ser devida a uma sequência de 4 cisteínas presente entre os domínios Central e a região interdomínio (IDL) que formam um possível sítio de ligação para metais (FISCHER *et al.*, 1988; SOUZA *et al.*, 1995). A proteína NifA de *B. japonicum* possui esta sequência e é sensível ao O₂ (FISCHER *et al.*, 1988), assim como as proteínas NifA de *Azospirillum lipoferum* (SHIGEMATSU *et al.*, 1997) e *A. brasilense* (ARSÈNE *et al.*, 1996 e ISHIDA, 1996). Já as proteínas NifA de *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* que não possuem este motivo são resistentes ao O₂ quando expressas em *E. coli* (FISCHER *et al.*, 1988).

Outra hipótese é que a NifA possa estar sendo modificada pelo oxigênio via outras proteínas que estariam convertendo-a da forma ativa para a inativa (FISCHER & HENNECKE, 1987), como ocorre no sistema NifLA de *K. pneumoniae* (AUSTIN *et al.*, 1994). Em *Bradyrhizobium japonicum* a inativação da proteína NifA pelo O₂ é relativamente rápida, sugerindo que seja via inativação direta da proteína por oxigênio e não por uma cascata regulatória (MORRET *et al.*, 1991). Morret e colaboradores (1991) mostraram que a proteína NifA de *B. japonicum* foi inativada por oxigênio e em seguida degradada, indicando que a primeira resposta ao oxigênio não seria a degradação.

Os resultados obtidos permitem sugerir que *in vitro* a proteína de fusão seja inativada pelo O₂, fato que isso explicaria a baixa atividade e diminuição da mesma quando purificada na presença de O₂. É preciso lembrar que a proteína que foi utilizada nos primeiros ensaios de atividade de ligação ao DNA, purificada na presença de oxigênio, foi eluída formando agregados. É possível que a formação do agregado proteico poderia protegê-la contra a ação do oxigênio. Nossos resultados indicam que o efeito do oxigênio sobre a proteína NifA de *H.*

seropedicae não é dependente de um sistema de regulação semelhante ao que ocorre com a NifA de *K. pneumoniae*, mas que a ação do O₂ seja diretamente sobre a proteína, provavelmente através do motivo Cys-X₁₁-Cys-X₁₉-Cys-X₄-Cys presente no domínio Central e região interdomínio.

Rego (1997) mostrou que a proteína NifA é capaz de ativar a transcrição dos genes *nif* na ausência de íons amônio e oxigênio em *H. seropedicae*. Nossos resultados mostram, entretanto, que a proteína His-Tag-NifA não conseguiu ativar a transcrição do promotor *nifH* em *E. coli*. A análise do perfil proteico das estirpes de *E. coli* expressando a proteína His-Tag-NifA, afasta a hipótese de não estar sendo expressa ou estar sofrendo proteólise, como descrito para a proteína NifA de *R. meliloti* expressa em *E. coli* (HUALA *et al.*, 1991). Resultado semelhante foi obtido em *E. coli* por Souza e colaboradores (1995b) trabalhando com a proteína de *H. seropedicae* e por Ishida (1996) com a proteína de *A. brasilense*. Estes dados sugerem a necessidade da presença de algum cofator ou uma proteína regulatória que ativaria a NifA em *E. coli*.

Ao contrário do que ocorreu com a proteína de fusão His-Tag-NifA, a proteína His-Tag-Central+C-terminal foi capaz de ativar a transcrição do promotor *nifH in vivo*. Esta ativação ocorreu somente na ausência de oxigênio e independente da concentração de íons NH₄⁺. Esse resultado mostra que em *E. coli* a proteína de fusão é inibida pelo oxigênio, semelhante ao que ocorre em *H. seropedicae*, no entanto, a ausência do domínio N-terminal tornou a proteína insensível a amônia. A insensibilidade à amônia apresentada pela proteína em *E. coli* confirma os resultados obtidos por Souza e colaboradores (1995b) indicando que a amônia parece ter seus níveis detectados direta ou indiretamente pelo domínio N-terminal em *H. seropedicae* (SOUZA *et al.*, 1995b). Efeito semelhante também foi descrito para a proteína

NifA de *A. brasilense* (ARSÈNE *et al.*, 1996). Recentemente, alguns autores têm sugerido que as proteínas NifA de *H. seropedicae* e *A. brasilense* possam ser reguladas pela proteína PII e que esta proteína poderia estar interagindo com o domínio N-terminal da proteína NifA (BENELLI, 1997 e ARSENE *et al.*, 1996).

Considerando os resultados obtidos até o momento, podemos sugerir que a proteína NifA de *H. seropedicae* integra estaria em uma conformação inativa em altas concentrações de íons NH_4 , sendo necessária a presença de alguma proteína regulatória (talvez PII) para a ativação da NifA na ausência de amônia. Em altas concentrações de íons NH_4^+ , é provável que o domínio N-terminal esteja interagindo com os demais domínios, impedindo a ativação da transcrição. Essa inibição não ocorre se o domínio N-terminal não estiver presente. Quando os níveis de íons amônio for baixo, a proteína reguladora interagiria com a NifA, através de seu domínio N-terminal, permitindo que esta assumia uma conformação adequada para a ativação da transcrição. Quando a concentração de íons NH_4^+ aumenta, a interação entre NifA e a proteína reguladora se desfaz, fazendo com que a NifA volte a assumir uma conformação inativa. A proteína reguladora necessária para esse processo estaria ausente em *E. coli* e, portanto, a NifA expressa neste organismo não apresentaria atividade. Já a retirada do domínio N-terminal da proteína NifA produz uma proteína ativa em *E. coli*, mas incapaz de responder aos níveis de íons amônio.

O efeito do O_2 sobre a atividade da proteína His-Tag-Central+C-terminal deverá ser melhor investigado, assim como o papel do domínio N-terminal na regulação de sua atividade.

Os resultados obtidos neste trabalho, juntos com aqueles da literatura, permitem a sugestão de um mecanismo de regulação dos genes *nif* em *H. seropedicae* (figura 15). Neste modelo a proteína NtrC ativa a transcrição do gene *nifA* em baixas concentrações de íons

amônio. A proteína NifA provavelmente é sintetizada numa forma inativa, mas em baixas concentrações de NH_4^+ PII-UMP interage com o domínio N-terminal, produzindo uma proteína NifA ativa. Quando os níveis de íons amônio ou oxigênio sobem NifA é inativada, bloqueando a transcrição dos operons *nif*.

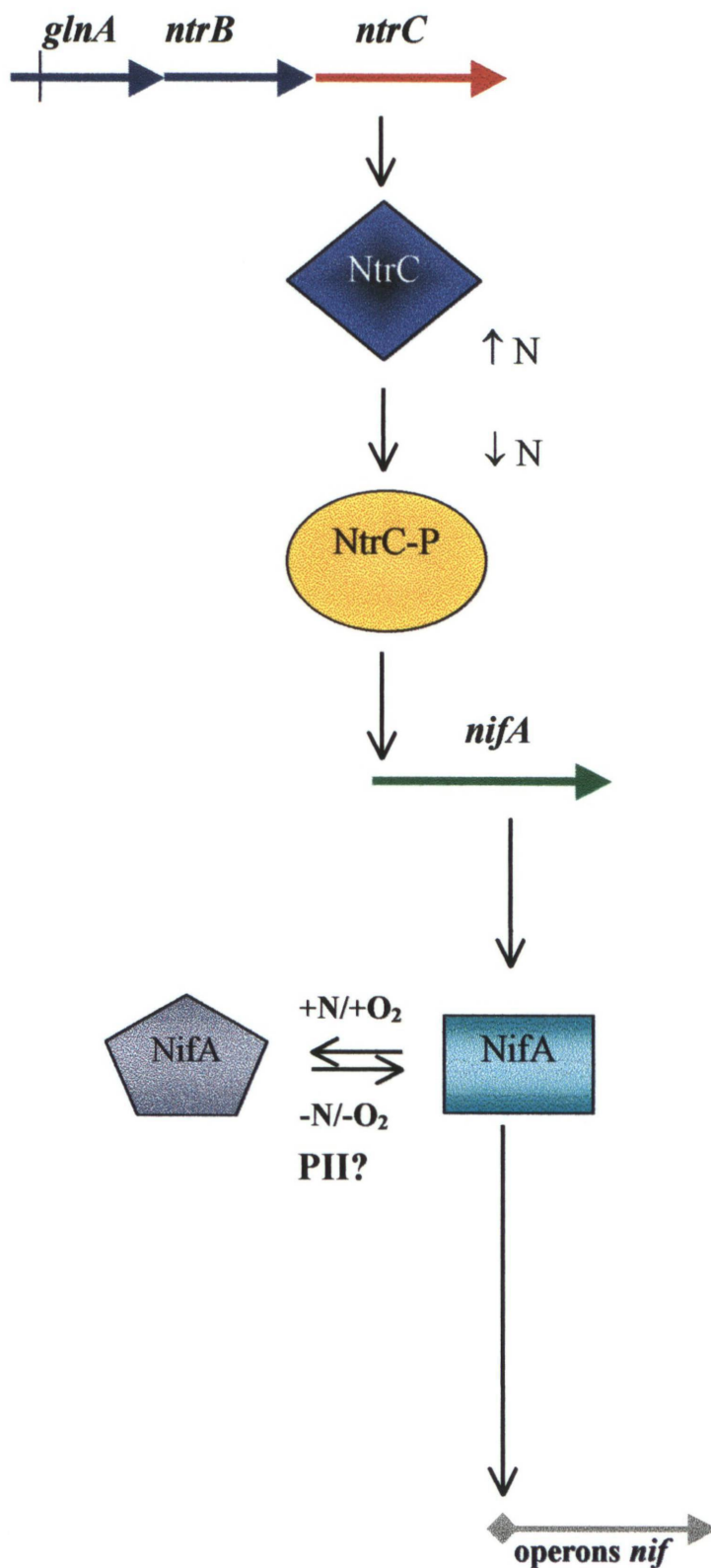


Figura 15 – Modelo do Mecanismo de Regulação da Fixação de Nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*.

6. CONCLUSÃO

1. A proteína NifA de *H. seropedicae* e seus domínios modulares N-terminal e Central+C-terminal apresentam-se, na sua maioria, na fração insolúvel do extrato celular, quando superexpressos em *E. coli* na forma de proteínas de fusão.
2. A proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal apresentou-se parcialmente solúvel no extrato celular, quando superexpressa em *E. coli*.
3. A proteína His-Tag-Central+C-terminal foi purificada com sucesso.
4. A proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal mostrou-se capaz de ligar-se, de uma forma específica, a região promotora do gene *nifB* de *H. seropedicae* *in vitro*.
5. A proteína de fusão His-Tag-Central+C-terminal mostrou-se capaz de ativar a transcrição do promotor do gene *nifH* de *K. pneumoniae* na ausência de oxigênio independente da concentração de NH_4^+ .

6. A proteína de fusão His-Tag-NifA mostrou-se incapaz de ativar a transcrição do promotor do gene *nifH* de *K. pneumoniae* *in vivo* em *E. coli*.
7. Os anticorpos policlonais produzidos contra a proteína de fusão GST-Central+C-terminal reconhecem a proteína NifA de *H. seropedicae*, mas não a de *K. pneumoniae*. Não foi verificado reconhecimento da proteína GST.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R.M.; 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*. J Biol Chem, 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 and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res., v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANTHAMATTEN, D. & HENNECKE, H. The regulatory status of the *fixL*-like and *fixJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet., v. 225, p. 38-48, 1991.
- ARIGONI, F.; KAMINSKI, P. A.; HENNECKE, H.; ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571: similarity of the *fixB* product with eukaryotic flavoproteins, characterization of *fixX*, and identification of *nifW*. Mol. Gen. Genet., v. 225, p. 514-520, 1991.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. J

Bacteriol., Washington, v. 178, p.4830-4838, 1996.

AUSTIN, S.; HENDERSON, N.; DIXON, R. Characterisation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NIFA and NIFL in vitro. Eur J Biochem, v. 187, p. 353-360, 1990.

AUSTIN, S.; DIXON, R. The procariotic enhancer-binding protein NTRC has a ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. EMBO J., Oxon, v. 11, p. 2219-2228, 1992.

AUSTIN, S.; BUCK, M.; CANNON, W.; EYDMANN, T.; DIXON, R. Purification and in “in vitro” activities of the native nitrogen fixation control proteins NifA and NifL. J. Bacteriol., Washington, v. 176, p. 3460-3465, 1994.

BATUT, J.; DAVERAN-MINGOT, 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*. EMBO J., v. 8, p. 1279-1286, 1989.

BAKER, M.E. Similarities between legume-*Rhizobium* communication and steroid-mediated intracellular communication in vertebrates. Can. J. Microbiol., v. 38, p. 541-547, 1992.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. An. Acad. Bras. Cienc., 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. Intl. J. Sys. Bact., Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHOFF, G. FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of a clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. Int. J. Sys. Bacteriol., v. 46, p. 802-819, 1996.

BENELLI, Elaine Machado. Análise funcional e estrutural da proteína controladora dos sistemas *ntr* e *nif*, a proteína PII de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1997. 108p. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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. Proc. Natl. Acad.Sci. USA., Washington, v.91, p.103-107, 1994.

- BERGER, D.K.; NARBERHAUS, F.; LEE, H.; KUSTU, S. In vitro studies of the domains of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. J. Bacteriol., Washington, v. 177, p.191-199, 1995.
- BISHOP, P. E.;JARLENSKI, D. M. L.; HETHERINGTON, D. R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. Proc. Nat. Acad.Sci. USA, Washington, v. 77, n. 12, p. 7342-7346, 1980.
- BLANCO, G.; DRUMMOND, M.; WOODLEY, P.; KENNEDY, C. Sequence and molecular analysis of the *nifL* gene of *Azotobacter vinelandii*. Mol. Microbiol., v. 9. p. 869-879, 1993.
- BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: a key to energetically viable biofuel production. Critical Reviews in Plants Siences, Boca Rato, v.4, p263-279, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive methhod for the quantification of micrograms quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, M.S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E.R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII - regulatory protein. Proc Natl Acad Sci USA, v. 68, p. 2949-2953, 1971.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem., v. 112, p. 195-203, 1981.

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

BUCK, M.; WOODCOCK, J.; CANNON, W.; MITCHENALL, L.; DRUMMOND, M. Positional requirements for the function of *nif*-specific upstream activator sequences. Mol. Gen. Genet., v. 210, p. 140-144, 1987.

BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., Washington, v. 164, p. 816-822, 1985.

BUKEMA, W. J.; SZETO, W. W.; LEMLEY, P. V.; ORME-JOHNSON, W. H.; AUSUBEL, F. M. Nitrogen fixation specific regulatory genes of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* share homology with the general nitrogen regulatory gene *ntrC* of *K. pneumoniae*. Nucl. Acids Res. v. 13, p. 4539-4555, 1985.

- BUIKEMA, W.J.; KLINGENSMITH, J.A.; GIBBONS, S.L.; AUSUBEL, F.M. Conservation of structure and location of *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae nifB* genes. J Bacteriol, Washington, v. 169, p. 1120-1126, 1987.
- CANNON, F. C.; DIXON, R. A.; POSTAGATE, J. R. Derivation and properties of F-prime factors in *Escherichia coli* carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol., v. 93, p. 11-25, 1976.
- CANNON, W.; CHARLTON, W.; BUCK, M. Organization and function of binding sites for the transcriptional activator NifA in the *Klebsiella pneumoniae nifE* and *nifU* promoters. J. Mol. Biol., v. 220, p. 915-931, 1991.
- CANNON, W.; BUCK, M. Central domain of the positive control protein NifA and its role in transcriptional activation. J Mol Biol, v. 225, p. 271-286, 1992.
- CHISNELL, J.R.; PREMAKUMAR, R.; BISHOP, P.E. Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol, Washington, v. 170, p. 27-33, 1988.
- CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M. The effect on the function of the transcriptional activator NtrC from *Klebsiella pneumoniae* of mutations in the DNA recognition helix. Nucl. Acids Res. v. 16, p. 4025-4039, 1988.

DAVID, M.; DAVERAN, M. L.; BATUT, J.; DEDIEU, A.; DOMERGUE, O.; GHAI, J.; HERTIG, C.; BOISTARD, P.; KAHN, D. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. Cell, Cambridge, v. 54, p. 671-683, 1988.

de MEL, V. S. J.; KAMBEROV, E. S. ; MARTIN, P. D.; ZHANG, J.; NINFA, A. J.; EDWARDS, B. F. P.; Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., v.243, p. 796-798, 1994.

DEAN, D.R.; BOLIN, J.T.; ZHENG, L. Nitrogenase metallocusters: structures, organization, and synthesis. J Bacteriol, Washington, v. 175, p. 6737-6744, 1993.

DIXON, R. O. D.; WHEELER, C. T. Nitrogen Fixation in Plants. Glasgow: Blackie, 1986, 157p.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. The genus *Azospirillum*. In: Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants. Madison: Science Tech. Publishers, 1987, 155p.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: Endophytic N₂ fixing bacteria. Cienc. Cult., (São Paulo), v.44, p. 310-313, 1992.

- DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R. *et al.* (eds.). New Horizons in Nitrogen Fixation. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 671-676.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. Soil Biol. Biochem., v. 29, p. 771-774, 1997.
- DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. Nature, v. 301, p. 302-307, 1983.
- DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. EMBO J. v. 5, p. 441-447, 1986.
- DRUMMOND, M.H.; WOOTTON, J.C. Sequence of *nifL* from *Klebsiella pneumoniae*: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. Mol Microbiol. v. 1, p. 37-44, 1987.
- DRUMMOND, M.H.; CONTRERAS, A.; MITCHENALL, L.A. The function of isolated domains and chimaeric proteins constructed from the transcriptional activators NifA and NtrC of *Klebsiella pneumoniae*. Mol Microbiol. v. 4, p. 29-37, 1990.

- DRUMMOND, M.; WALMSLEY, J.; KENNEDY, C. Expression from the *nifB* promoter of *Azotobacter vinelandii* can be activated by NifA, VnfA, or AnfA transcriptional activators. J Bacteriol, Washington. v. 178, p. 788-792, 1996.
- EADY, R. R.; Isolation and characterization of various nitrogenases. Meth. Enzymol., v. 69, p. 753-778, 1980.
- EARL, C. D.; RONSON, C. W.; AUSUBEL, F. M. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* fixA, fixB, fixC, and fixX genes. J.Bacteriol., Washington, v. 169, p. 1127-1136, 1987.
- EMERICH, D.W.; BURRIS, R.H. Interactions of heterologous nitrogenase components that generate catalytically inactive complexes. Proc Natl Acad Sci USA, v. 73, p. 4369-4373, 1976.
- 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*. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, v. 36, p. 80-85, 1986.
- FISCHER, H. M.; HENNECKE, H. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* *nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. Mol. Gen. Genet. v. 209, p. 621-626, 1987.

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

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiol. Rev., v. 58, p. 352-386, 1994.

FRANGIONI, J. V.; BENJAMIN G. N. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. Anal. Biochem., v. 210, p. 179-187, 1993.

FU, H.; BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. J Bacteriol., v. 171, p. 3168-3175, 1989.

FUHRMANN, M.; FISCHER, H. M.; HENNECKE, H. Mapping of *Rhizobium japonicum* *nifB*, *fixBC*, and *fixA* like genes and identification of the *fixA* promoter. Mol. Gen. Genet., v. 199, p. 315-322, 1985.

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*. Science (Washington DC), v.257, p.1653-1659, 1992.

- GILLES-GONZALES, M. A.; DITTA, G. S.; HELINSKI, D. R. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. Nature, London, v. 350, p. 170-172, 1991.
- GOVEZENSKY, D. E.; BOCHKAREVA, E. S.; ZAMIR, A.; GIRSHOVICH, A. S. Chaperonins as potential gene regulatory factors: *in vitro* interaction and solubilization of NifA, the nif transcriptional activator, with GroEL. J. Biol. Chem. v. 269, p. 14003-14006, 1994.
- GRÖNGER, P.; MANIAN, S.S.; REILÄNDER, H.; O'CONNEL, M.; PRIEFER, U.B.; PÜHLER, A. Organization and partial sequence of a DNA region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL6JI containing the genes *fixABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. Nucl. Acids Res., v. 15, p. 31-49, 1987.
- GUBLER, M.; HENNECKE, H. Regulation of *fixA* gene and *fixBC* operon in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol., Washington, v.170, p.1205-1214, 1988.
- HALES, B.J.; LANGOSCH, D.J.; CASE, E.E. Isolation and characterization of a second nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii* [published erratum appears in J Biol Chem 1987 Mar 15;262(8):3927]. J Biol Chem, v. 261, p. 15301-15306, 1986a.
- HALES, B.J.; CASE, E.E.; MORNINGSTAR, J.E.; DZEDA, M.F.; MAUTERER, L.A. Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. Biochemistry, v. 25, p. 7251-7255, 1986b.

- HARTMANN, A.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. J Bacteriol, v. 169, p. 944-948, 1987.
- HAWKES, T.; MERRICK, M.; DIXON, R. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., v. 201, p. 492-498, 1985.
- HAWKINS, F. K. L.; JOHNSTON, A. W. B. Transcription of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* gene needed for melanin synthesis is activated by *nifA* of *Rhizobium* and *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Microbiol., v. 2, p. 331-337, 1988.
- HE, L.; SOUPENE, E; KUSTU, S. A new role for NtrC in nitrogen regulation of NifL activity. In: 11th INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION (1997 : Paris). **Resumos...** Paris : Instituto Pasteur, 1997. p. 11.
- HIGGINS, R. C.; DAHMUS, M. E. Rapid vizualization of protein bands in preparative SDS-polyacrilamide gels. Anal. Biochem. v. 93, p. 257-260, 1979.
- HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON,R. Azotobacter vinelandii NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Washington, v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HOLLAND, D.; ZILBERSTEIN, A.; ZAMIR, A.; SUSSMAN, J.L. A quantitative approach to sequence comparisons of nitrogenase MoFe protein alpha- and beta-subunits including the newly sequenced *nifK* gene from *Klebsiella pneumoniae*. Biochem J. v. 247, p. 277-285, 1987.

HOOVER, T. R.; SANTERO, E.; PORTER, S.; KUSTU, S. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. Cell, v. 63, p. 382-390, 1990.

HOWARD, K.S.; MCLEAN, P.A.; HANSEN, F.B.; LEMLEY, P.V.; KOBLAN, K.S.; ORME-JOHNSON, W.H. *Klebsiella pneumoniae nifM* gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., v. 261, 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. v. 264, p. 11270-11274, 1989.

HOWARD, J.B.; REES, D.C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. Annu. Rev. Biochem., v. 63:235-64, p. 235-264, 1994.

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

171, p. 3354-3365, 1989.

HUALA, E.; MOON, A. L.; AUSUBEL, F. M. Aerobic inactivation of *Rhizobium meliloti* NifA in *Escherichia coli* is mediated by *lon* and two newly identified genes, *snoB* and *snoC*. J. Bacteriol., Washington, v. 173, p. 382-390, 1991.

HUNT, T.P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 8453-8457, 1985.

IIISMA, S. E.; EALING P. M.; SCOTT, K. F.; WATSON, J. M. Molecular linkage of the *nif/fix* and *nod* gene regions in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Mol. Microbiol., v. 3, p. 1753-1764, 1989.

IIISMAA, S. E.; WATSON, J. M. The *nifA* gene product from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* lacks the N-terminal domain found in other NifA proteins. Mol. Microbiol., v. 3, p. 943-955, 1989.

IOANNIDIS, I.; BUCK, M. Nucleotide sequence of the *Klebsiella pneumoniae nifD* gene and predicted amino acid sequence of the subunit of nitrogenase MoFe protein. Biochem. J., London, v.247, p.287-291, 1987.

- ISHIDA, Maria Lúcia. Construção e análise fisiológica de plasmídeos recombinantes capazes de expressar gene *nifA* de *Azospirillum brasilense*. Curitiba, 1996. 101p. Tese (mestrado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- JACOBSON, M.R.; CASH, V.L.; WEISS, M.C.; LAIRD, N.F.; NEWTON, W.E.; DEAN, D.R. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. Mol Gen Genet, v. 219, p. 49-57, 1989.
- KAHN, D.; DAVID, M.; DOMERGUE, O.; DAVERAN, M.L.; GHAI, J.; HIRSCH, P.R.; BATUT, J. *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen-fixation. J Bacteriol, v. 171, p. 929-939, 1989.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. J Biol Chem, Baltimore, v. 270, p. 17797-17807, 1995.
- KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Involvement of *fixLJ* in the regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*. Mol. Microbiol. v. 5, p. 665-673, 1991.
- 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*. Mol. Microbiol. v. 5, p. 1983-1991, 1991.

KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 85, p. 4976-4980, 1988.

KIM, J.; WOO, D.; REES, D.C. X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution. Bioch., v. 32, p. 7104-7115, 1993.

KIM, J.; REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochem., v. 33, p. 389-397, 1994.

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

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. P.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U. Structural organization the nitrogen fixation genes contiguous to *nifHDK* genes in *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVIª REUNIÃO ANUAL DA SBBq(1997:Caxambu). **Resumos** Caxambu, 1997.p. 50.

KLEINER, D. Biochem. Biophys. Acta. Amsterdã, v. 639, p. 41-52, 1981.

KLOSE, K.E.; WEISS, D.S.; KUSTU, S. Glutamate at the site of phosphorylation of

J Mol Biol, v. 232, p. 67-78, 1993.

KUSTU, S.; SANTERO, E; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of $\sigma^{54}(ntrA)$ -Dependent Genes is Probably United by a Common Mechanism. Microbiol. Rev., Washington, v.53, p. 367-376, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. Nature, (Lond.), v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, C.; LEVIN, A.; BRANTON, D. Copper staining: A five minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gels. Anal. Biochem., v. 166, p. 308-312, 1987.

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

LOWERY, R.G.; SAARI, L.L.; LUDDEN, P.W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation *in vitro*. J.Bacteriol., Washington, v.166, n.2, p.513-518, 1986.

MACHADO, I. M. P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum*

seropedicae. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 29, p. 1599-1602, 1995.

MAGASANIK, B. Regulation of transcription of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* by protein phosphorylation. Biochimie, v. 71, p. 1005-1012, 1989.

MANDON, K.; HILLEBRAND, H.; MOUGEL, C.; DESNOUES, N.; DREYFUS, B.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Characterization of *fixK*-regulated *Azorhizobium caulinodans* genes, p. 478. In PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. (ed), New horizons in nitrogen fixation. 1993. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

MANDON, K.; KAMINSKI, P. A.; MOUGEL, C.; DESNOUES, N.; DREYFUS, B.; ELMERICH, C. Role of the *fixGHI* region of *Azorhizobium caulinodans* in free-living and symbiotic nitrogen fixation. FEMS Microbiol.Lett., v. 114, p. 185-190, 1993.

MANDON, K.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Functional analysis of the *fixNOPQ* region of *Azorhizobium caulinodans*. J. Bacteriol., Washington, v. 176, p.2560-2568, 1994.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W.; PÜHLER, A. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Gen. Genet., v. 212, p. 27-37, 1988. 1988

MERRICK, M.; HILL, S. HENNECKE,; HAHN, M. DIXON, R.; KENNEDY, C.

Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*.

Mol.Gen.Genet., Berlin, v.185, p.75-81, 1982.

MERRICK, M. J. Organisation and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella*

and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. Nitrogen

fixation: hundred years after Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, p. 293-302, 1988.

MERRICK, M.J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of

the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. EMBO J., v. 2, p. 39-44, 1983.

MERRICK, M. J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Simbiotic

Bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H. ; EVANS, H. J. (eds). Biological Nitrogen

Fixation. London: Chapman & Hall, New York, 1992a. p. 835-876.

MERRICK, M. & CHAMBERS, S. The helix-turn-helix motif of σ^{54} is involved in

recognition of the -13 promoter region. J. Bacteriol., v. 174, p. 7221-7226, 1992b.

MERRICK, M. J. Organisation and regulation of nitrogen fixation genes. In PALACIOS, R.;

MORA, J.; NEWTON, W. E. (eds.), New horizons in nitrogen fixation. Kluwer

Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, p. 1-12, 1993.

MERRICK, M.J. & EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. Microbiol. Rev., v. 59, p. 604-622, 1995.

MICHELIS, J.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and sequence of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* fixA gene. Biochem. Biophys. Acta, v. 1144, p. 232-233, 1993.

MILLER, J. H.. Experiments in molecular genetics. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, 1990,. p. 325-355.

MORRET, E.; BUCK, M. NifA dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 85, p. 9401-9405, 1988.

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

MORJANA, N. A.; BARRY, J. M.; GILBERT, H. F. Guanidine hydrochloride stabilization of a partially unfolded intermediate during the reversible denaturation of protein disulfide isomerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 90, p. 2107-2111, 1993.

- MORRET, E; FISCHER, H. M.; HENNECKE, H. Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. J. Bacteriol., Washington, v. 173, p. 3478-3487, 1991.
- NARBERHAUS, F.; LEE, H.S.; SCHMITZ, R.A.; HE, L.; KUSTU, S. The C-terminal domain of NifL is sufficient to inhibit NifA activity. J Bacteriol, v. 177, p. 5078-5087, 1995.
- NIXON, B.T.; RONSON, C.W.; AUSUBEL, F.M. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. Proc Natl Acad Sci USA, v. 83, p. 7850-7854, 1986.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News, v. 63, p. 366-370, 1997.
- OLIVER, G. ; GOSSET, G.; SANCHEZ-PESCADOR, R.; LOZOYA, E.; KU, L. M.; FLORES, N.; BECERRIL, B.; VALLE, F.; BOLIVAR, F. Determination of the nucleotide sequence for the glutamate synthase structural genes of *Escherichia coli* K-12. Gene, v. 60, p. 1-11, 1987.
- PAGE, W.J.; COLLINSON, S.K. Molybdenum enhancement of nitrogen fixation in a Mo-starved *Azotobacter vinelandii* *nif*- mutant. Can. J. Microbiol., v. 28, p. 1173-1180, 1982.

PAUL, W.; MERRICK, M. The nucleotide sequence of the *nifM* gene of *Klebsiella pneumoniae* and identification of a new *nif* gene: *nifZ*. Eur. J. Biochem., v. 170, p. 259-265, 1987.

PAUL, W.; MERRICK, M. The roles of the *nifW*, *nifZ* and *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. Eur. J. Biochem., v. 178, p. 675-682, 1989.

PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc. Lett., Amesterdã, v. 23, p. 95-101, 1984

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

PEDROSA, F.O. Physiology ,biochemistry and genetics of *Azospirillum* and others root-associated nitrogen-fixing bacteria. Critical reviews in plant sciences, Boca Raton, v.6, n.4, p.345-384, 1988.

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. (ed). Nitrogen fixation with non-legumes. Kluwer Academic Publisher, 1989, p. 155-163.

- PEDROSA, F.O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. M. P.; STEFFENS, M. B. R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E. M.; MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; ISHIDA, M. L.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. Soil Biol. Biochem., v. 29, p. 843-846, 1997.
- 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*. Plant. Soil.; Dordrecht, v. 137, p. 61-65, 1991.
- POPE, M.R.; MURRELL, S.A.; LUDDEN, P.W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphorylation of a specific arginyl residue. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 82, p. 3173-3177, 1985.
- POSTGATE, J.R. Biological nitrogen fixation: Fundamental. Phil. Trans. R. Soc. Lond., Brighton, v.296, p.375-85, 1982.
- PREISIG, O.; ANTHAMATTEN, D.; HENNECKE, H. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 90, p. 3309-3313, 1993.

- REGO, Fabiane Gomes de Moraes. Sequenciamento do gene *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterização da sua região promotora. Curitiba, 1997. 143p. Tese (mestrado em 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. Proc Natl Acad Sci USA, Washington, v. 82, p. 1979-1983, 1985.
- RICKWOOD, D.; HAMES, B.D. Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach. IRL Press. 2^a edição. 1990.
- 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*. J.Bacteriol., Washington, v. 136, nº 1, p. 267-279, 1978.
- ROBSON, R.L.; POSTGATE, J.R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. Annu Rev Microbiol, v. 34:183-207, p. 183-207, 1980.
- ROLL, J.H.; SHAH, V.K.; DEAN, D.R.; ROBERTS, G.P. Characteristics of NifNE in *Azotobacter vinelandii* strains. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 270, p. 4432-4437, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDERS, D.A.; GILLECE-CASTRO, B.L.; BURLINGAME, A.L.; KOSHLAND JR, D.E.

Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. J Bacteriol., v. 174, p. 5117-5122, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. Sequencing with chain-terminating

inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTERO, E.; HOOVER, T.; KEENER, J.; KUSTU, S. *In vitro* activity of the nitrogen

fixation regulatory protein NifA. Proc Natl Acad Sci USA, v. 86, p. 7346-7350, 1989.

SASSE-DWIGHT, S.; GRALLA, J.D. Probing the *Escherichia coli* *glnALG* upstream

activation mechanism *in vivo*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Washington, v. 85, p. 8934-8938, 1988.

SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHLESSMAN, J. L.; HOWARD, J. B.; REES, D. C.

Structure of ADP.AIF₄⁻ stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. Nature, London, v. 387, p. 370-376, 1997.

SCHNEIDER, K.; MULLER, A.; SCHRAMM, U.; KLIPP, W. Demonstration of a

molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. Eur. J. Biochem., Heidelberg, v. 195, p. 653-661, 1991.

SHAH, V.K.; STACEY, G.; BRILL, W.J. Electron transport to nitrogenase: purification and characterization of pyruvate: flavodoxin oxidoreductase, the *nifJ* gene product. J.Biol.Chem., Baltimore, v. 258, p. 12064-12068, 1983.

SHAH, V. K.; HOOVER, T.R.; IMPERIAL, J.; PAUSTIAN, T.D.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Role of *nif* gene products and homocitrate in the biosynthesis of iron-molibdenum cofactor. In: BOTHE, H. de BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E. Nitrogen Fixation: Hundred years after. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1988. p. 115-120.

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. J Biol Chem, v. 269, p. 1154-1158, 1994.

SHIAU, S.P.; CHEN, P.; REITZER, L.J. Effects of insertions and deletions in *glnG* (*ntrC*) of *Escherichia coli* on Nitrogen Regulator-I dependent DNA binding and transcriptional activation. J Bacteriol, v. 175, p. 190-199, 1993.

SIDDAVATTAM, D.; NICKLES, A.; HERTERICH, S.; STEIBL, H.D.; KREUTZER, R.; KLINGMULLER, W. Site-specific mutagenesis in *Enterobacter agglomerans*: construction of *nif B* mutants and analysis of the gene's structure and function. Mol Gen Genet, v. 249, p. 526-532, 1995.

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

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

SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Deletions analysis of the promoter region of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae*. In: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. TIKHONOVICH, I.A.; NIKOLAI, A.P.; VASSILY, I.R.; WILLIAM, E.N. eds. X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p.260, 1995a.

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

STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. P.; SOUZA, E. M.; MACHADO, H. B.; PERSUHN, D. C.; RIGO, L. U. Sequence analysis of the regulatory genes *ntrB* and *ntrC* of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVIª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE

BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997 : Caxambu).

Resumos... Caxambu , 1997. p. 50.

SZETO, W. W.; ZIMMERMAN, J. L.; SUNDARESAN, V.; AUSUBEL, F.M. A *Rhizobium meliloti* symbiotic regulatory gene. Cell, v. 36, p. 1035-1043, 1984.

SZETO, W. W.; NIXON, B. T.; RONSON, C. W.; AUSUBEL, F. M. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti* ntrC gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. J. Bacteriol., Washington, v. 169, p. 1423-1432, 1987.

TEIXEIRA, Kátia Regina. Isolamento e caracterização do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae* Z78. 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. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THÖNY, B.; ANTHAMATTEN, D.; HENNECKE, H. Dual control of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic nitrogen fixation regulatory operon fixRnifA: analysis of cis- and trans-acting elements. J. Bacteriol., Washington, v. 171, p. 4162-4169, 1989.

TRAVERS, A.A.; BURGESS, R.R. Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. Nature, London, v. 222, p. 537-540, 1969.

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

WANG, S.Z.; DEAN, D.R.; CHEN, J.S.; JOHNSON, J.L. The N-terminal and C-terminal portions of NifV are encoded by two different genes in *Clostridium pasteurianum*. J. Bacteriol., v. 173, p. 3041-3046, 1991.

WASSEM, R.; PEDROSA, F. P.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Structural and functional analysis of the *nifA* promoter of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXVI^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (1997 : Caxambu). **Resumos...** Caxambu , 1997. p. 50.

WEISS V, MAGASANIK B. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, Washington, v. 85, p. 8919-8923, 1988.

WEISS, D.S.; BATUT, J.; KLOSE, K.E.; KEENER, J.; KUSTU, S. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. Cell, v. 67, p. 155-167, 1991.

WEISS, V.; CLAVERIE-MARTIN, F.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen-regulator I (NRI) of *Escherichia coli* induces the strong cooperative binding to DNA essential for the activation of transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Washington, v. 89, p. 5088-5092, 1992.

WHITEHALL, S.; AUSTIN, S.; DIXON, R. DNA supercoiling response of the σ^{54} -dependent *Klebsiella pneumoniae nifL* promoter *in vitro*. J Mol Biol, 1992.

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

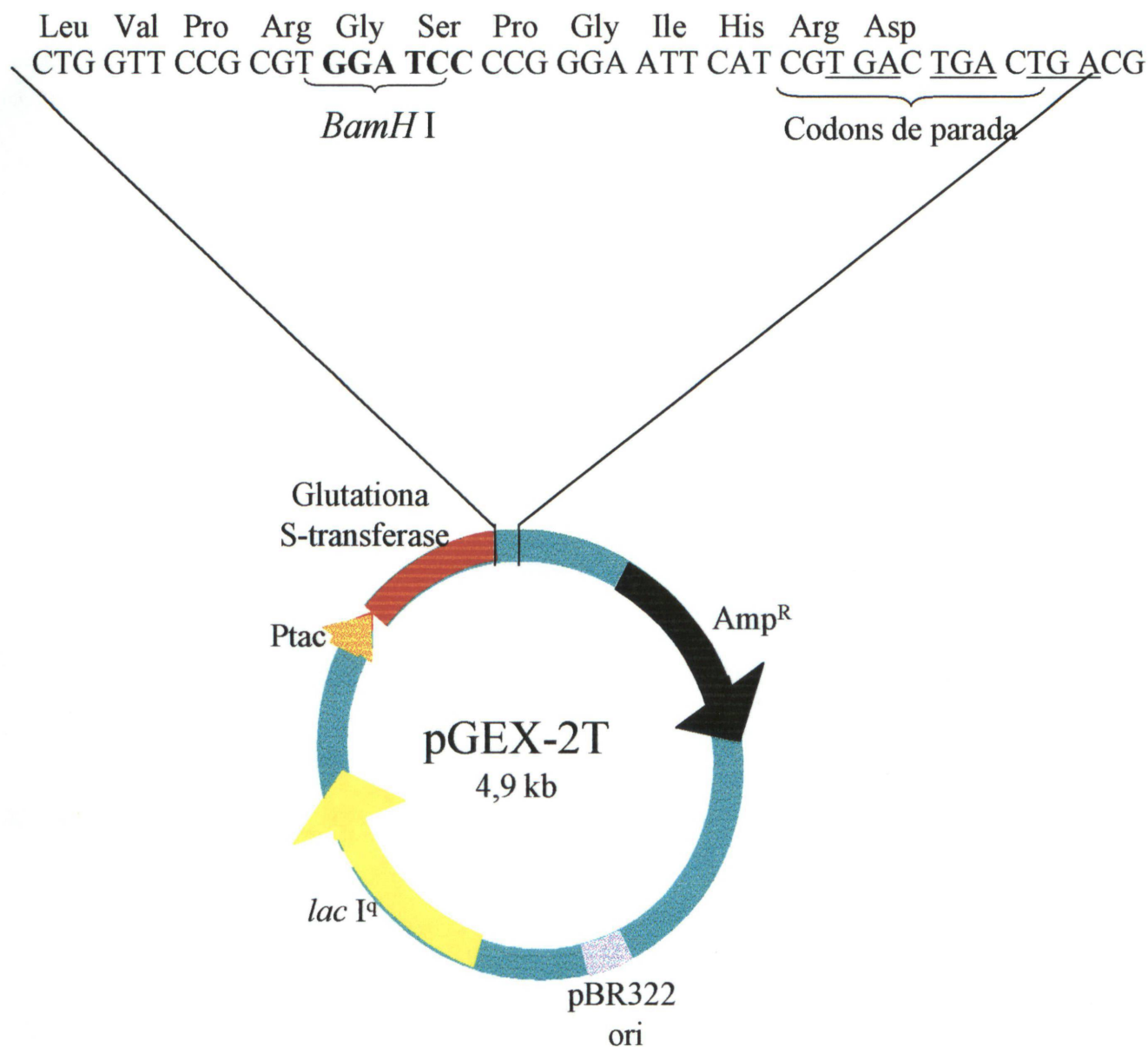
WYMAN, C.; ROMBEL, I.; NORTH, A.K.; BUSTAMANE, C.; KUSTU, S. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. Science, Washington DC, v. 275, p. 1658-1661, 1997.

YAMASHITA, M. M.; ALMASSY, R. J.; JANSON, C. A.; CASCIO, D.; EISENBERG, D. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5^Å resolution. J. Biol. Chem., v. 264, p. 17681-17690, 1989.

YATES, M. G. Biochemistry of nitrogen fixation. In: MIFTIN, B. ed. The biochemistry of plants. New York: Academic Press, v. 5, p. 1-64, 1980

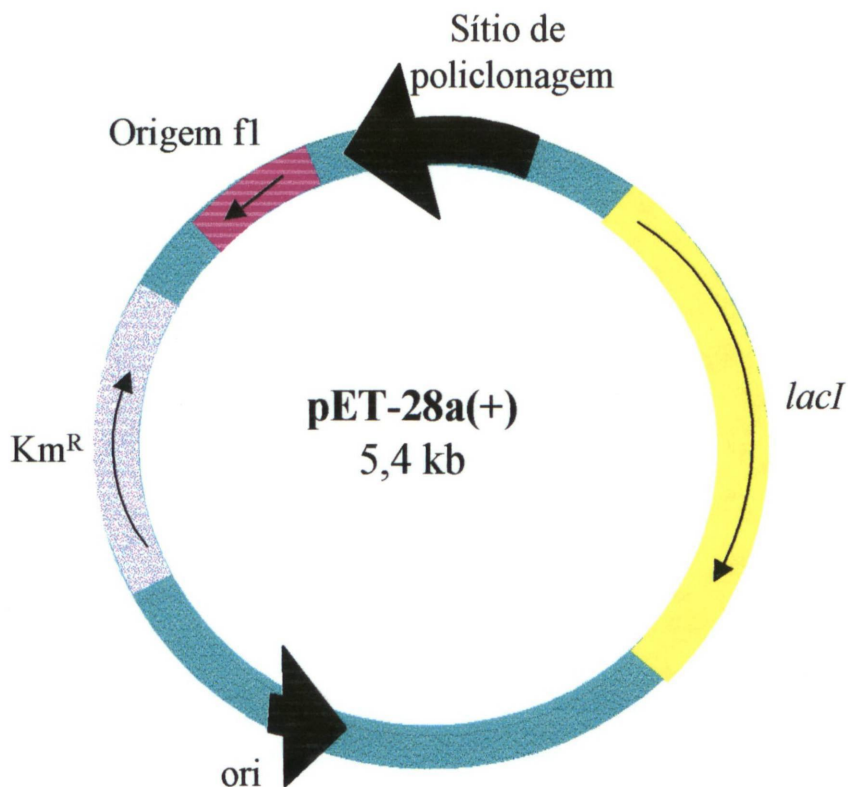
ZHENG, L.; WHITE, R. H.; CASH, V. L. JACK, R. F.; DEAN, D.R. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 90, p. 2754-2758, 1993.

ZHENG, L.; DEAN, D.R. Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulphur cluster. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 269, p. 18723-18726, 1994.



- “primer”- **pGEX5**’ - 5’-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3’
(sequência complementar aos nucleotídeos 869-891 pGEX2T)
- “primer”- **pGEX3**’ - 5’-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3’
(sequência complementar aos nucleotídeos 1020-998 pGEX2T)

APÊNDICE 1 - Vetor de expressão pGEX2T (Pharmacia)



promotor T7
Operador *lac*

AGATCTCGATCCCGCGAAAT**TAATACGACTCACTATAGG**GGAATTGTGAGCG

rbs

GATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG**GAAGG**AGATAT

Nco I
His●Tag

ACCATGGGCAGCAGCC**CATCATCATCATCA**CAGCAGCGGCCTGGTGCCGC

T7●Tag
*Bam*HI

GCGGCAGCCAT**ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT**CGC**GGATC**

CGAATTGCAGCTCCGTGACAAAGCTTGCGGCCGCACTCGAG

APÊNDICE 2 - Vetor de expressão pET28a (Novagen)