

NEW 807

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA E DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**O OPERON *fixABCX* DE *Azospirillum brasilense* Sp7 É REGULADO POR UM  
PROMOTOR DEPENDENTE DE NifA E CODIFICA POLIPEPTÍDEOS  
HOMÓLOGOS AOS PRODUTOS DOS GENES ETF'S**

**Raul Antonio Sperotto**

Trabalho apresentado como conclusão de curso para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Orientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Pereira Passaglia e  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Irene Silveira Schrank

Porto Alegre

2003

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Luciane M. P. Passaglia, pela orientação, ensinamentos, incentivos e companheirismo sempre demonstrado ao longo da iniciação científica.

À Dra. Irene S. Schrank pela sua sabedoria, companheirismo e pela oportunidade de realização do meu estágio de Iniciação Científica junto ao grupo de trabalho sob sua coordenação.

Aos atuais colegas de laboratório Ricardo, Mateus, Fernando, Shana, Lisângela e Clarissa pelo companheirismo, cooperação e momentos de descontração.

Aos antigos colegas de laboratório Deise, Samanta, René, Gean, Guilherme, Paola, Christopher, Carlos, Jeferson por todos os momentos compartilhados.

Ao Dr. Sérgio C. da Silva pela paciência em ensinar e re-ensinar a trabalhar com alguns programas computacionais.

Ao pessoal do laboratório 205, 213 e 107, em especial à Valéria, Luciano, Rúbia, Ana Paula e Márcia por toda ajuda e companheirismo dispensados durante este tempo.

Ao pessoal do seqüenciamento, Cristiane, Cristiano, Deise e Adriana, pela paciência em ensinar as técnicas e pela amizade.

Ao Milton e Paulo da lavagem, por nos ajudarem a manter a ordem no laboratório.

A todos os funcionários e amigos do Centro de Biotecnologia e Departamento de Genética, em especial à Sílvia e Elmo.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Ricardo, Rafael, Diogo, Janette e Arthur, pelos conhecimentos compartilhados e pela grande amizade.

A todos colegas do curso de Biologia, pelas festas e alegrias compartilhadas durante estes anos de graduação.

Ao pessoal do Núcleo de Aracnologia da UFRGS, Estevam, CB, Cristian, Ernesto e Aldo.

Aos meus irmãos e aos meus pais, Wilson e Marlene, por todo o apoio ao longo do curso.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b>	1
<b>RESUMO</b>	3
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Fixação biológica do nitrogênio	4
1.2 <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	7
1.3 Bioquímica da fixação do nitrogênio	8
1.4 Genética da fixação do nitrogênio	10
1.5 Estrutura dos genes envolvidos no processo de fixação do nitrogênio em <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	12
1.6 Regulação da fixação do nitrogênio	14
1.6.1 Regulação da fixação do nitrogênio em <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	18
1.7 Operon <i>fixABCX</i>	20
1.8 Objetivos	21
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
2.1 Materiais	
2.1.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos	23
2.1.2 Meios de cultura	24
2.1.3 Antibióticos, soluções, tampões e reagentes	26
2.1.4 Enzimas	26
2.1.5 Oligonucleotídeos	26
2.2 Procedimentos experimentais	
2.2.1 Amplificação de fragmentos de DNA	27

2.2.2	Eletroforese de DNA em gel de agarose	27
2.2.3	Purificação de fragmentos de DNA	28
2.2.4	Clivagem de DNA com enzimas de restrição	28
2.2.5	Ligação de DNA	28
2.2.6	Mutagênese sítio-direcionada	28
2.2.7	Transformação bacteriana	29
2.2.8	Seleção dos recombinantes	30
2.2.9	Extração de DNA plasmidial	31
2.2.10	Seqüenciamento de DNA	32
2.2.11	Teste de atividade da $\beta$ -galactosidase	32
2.2.12	Alinhamento de seqüências	33

### 3. RESULTADOS

3.1	Clonagem da região promotora do operon <i>fixABCX</i>	34
3.2	Medida da atividade da região promotora do operon <i>fixABCX</i>	36
3.3	Análise nucleotídica da região promotora do operon <i>fixABCX</i>	37
3.4	Clonagem da região promotora do operon <i>fixABCX</i> contendo as alterações nucleotídicas no sítio de reconhecimento para o fator $\sigma^{70}$ de <i>E. coli</i>	37
3.5	Medida da atividade da região promotora alterada	42
3.6	Homologia das proteínas FixABCX de <i>A. brasilense</i> com seqüências de outras proteínas disponíveis no banco de dados	43

### 4. DISCUSSÃO

4.1	Atividade da região promotora do operon <i>fixABCX</i> de <i>A. brasilense</i> é dependente da presença da proteína NifA	50
4.2	Função das proteínas FixABCX de <i>A. brasilense</i>	54

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
-------------------------------	----

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

A	adenina
Ac	acetato
AMP	monofosfato de adenosina
atm	atmosferas
ATP	trifosfato de adenosina
Ap <sup>R</sup>	resistente à Ampicilina
C	citossina
C	carbono
°C	graus Celsius
Cl	cloro
<i>cluster</i>	agrupamento
DNA	ácido desoxirribonucléico
ETF	<i>electron transfer flavoprotein</i> = flavoproteína transportadora de elétrons
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
Fe	ferro
G	guanina
H	hidrogênio
IHF	<i>integration host factor</i> = fator de integração ao hospedeiro
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
K	potássio
Kb	quilobase = 10 <sup>3</sup> pares de bases
KDa	quilodaltons
<i>lacZ</i>	gene que codifica a enzima β-galactosidase
LB	meio de cultivo Luria Bertani
M	molar
Mg	magnésio

Mo	molibdênio
N	nitrogênio
N <sub>2</sub>	nitrogênio molecular
Na	sódio
NH <sub>3</sub>	amônia
O	oxigênio
OD	densidade ótica
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactosídeo
ORF	<i>open reading frame</i> = seqüência aberta de leitura
pb	par de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = reação em cadeia da polimerase
Pi	fosfato inorgânico
<i>primer</i>	oligonucleotídeo iniciador
RNase	ribonuclease
S	enxofre
SDS	dodecil sulfato de sódio
T	timina
Tc <sup>R</sup>	resistente à Tetraciclina
TEB	Tris, EDTA e Ácido Bórico
UAS	<i>upstream activator sequence</i> = seqüência ativadora à montante
UV	radiação ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-tiogalactopiranosídeo

## RESUMO

O processo de fixação biológica do nitrogênio permite que este composto, inacessível na sua forma molecular ( $N_2$ ), possa ser incorporado pelos vegetais e por outros organismos que destas plantas se alimentarem. Esse processo é realizado por microrganismos especializados chamados diazotróficos. Fazendo parte desse grupo estão as bactérias do gênero *Azospirillum*. Para realizar a transformação do  $N_2$  em formas quimicamente reativas (por exemplo, amônia), esses microrganismos utilizam o sistema enzimático da nitrogenase. Este sistema é bastante complexo e depende da ativação coordenada de diversos genes, entre eles os genes *fixABCX*. Em *A. brasilense*, estes 4 genes formam um único operon e são transcritos conjuntamente. A região promotora desse operon possui elementos que estão presentes em todos os genes que participam do processo de fixação biológica do nitrogênio, destacando-se: 3 seqüências chamadas UAS (*upstream activator sequence*) que servem para ancoragem da proteína ativadora NifA, um sítio de ligação para a proteína IHF (*integration host factor*) e um elemento promotor nas posições -24 (GG) e -12 (GC), local de ligação da RNA polimerase complexada com o fator sigma alternativo ( $\sigma^{54}$ ). Além destas seqüências, há um possível elemento promotor na posição -35/-10, que pode ser reconhecido pelo fator  $\sigma^{70}$  de *Escherichia coli*. Para verificar a atividade da região reguladora do operon *fixABCX*, foi realizado, neste trabalho, a fusão entre a região promotora e o gene-repórter *lacZ*. Para tanto, a região promotora (contendo alterações nucleotídicas no sítio de reconhecimento para o fator  $\sigma^{70}$  de *E. coli*) foi isolada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), gerando um fragmento de 273 pares de bases, que foi clonado no vetor pMC1403, gerando o recombinante pMCpfixmut. Para testar a necessidade da presença da proteína NifA na ativação da transcrição, o plasmídeo recombinante foi transformado em linhagens de *E. coli* MC1061 contendo ou não o plasmídeo pCK3, que expressa constitutivamente a proteína NifA de *Klebsiella pneumoniae*. Foi demonstrado que o promotor do operon *fixABCX* segue o sistema de regulação encontrado em outros genes *nif* ou *fix*, ou seja, somente é ativo na presença da proteína NifA. Através da elevada homologia entre as proteínas FixABCX com flavoproteínas transportadoras de elétrons eucarióticas e procarióticas, também foi possível sugerir que estes quatro genes desempenhem uma função relacionada ao transporte de elétrons para o processo de fixação biológica do nitrogênio.

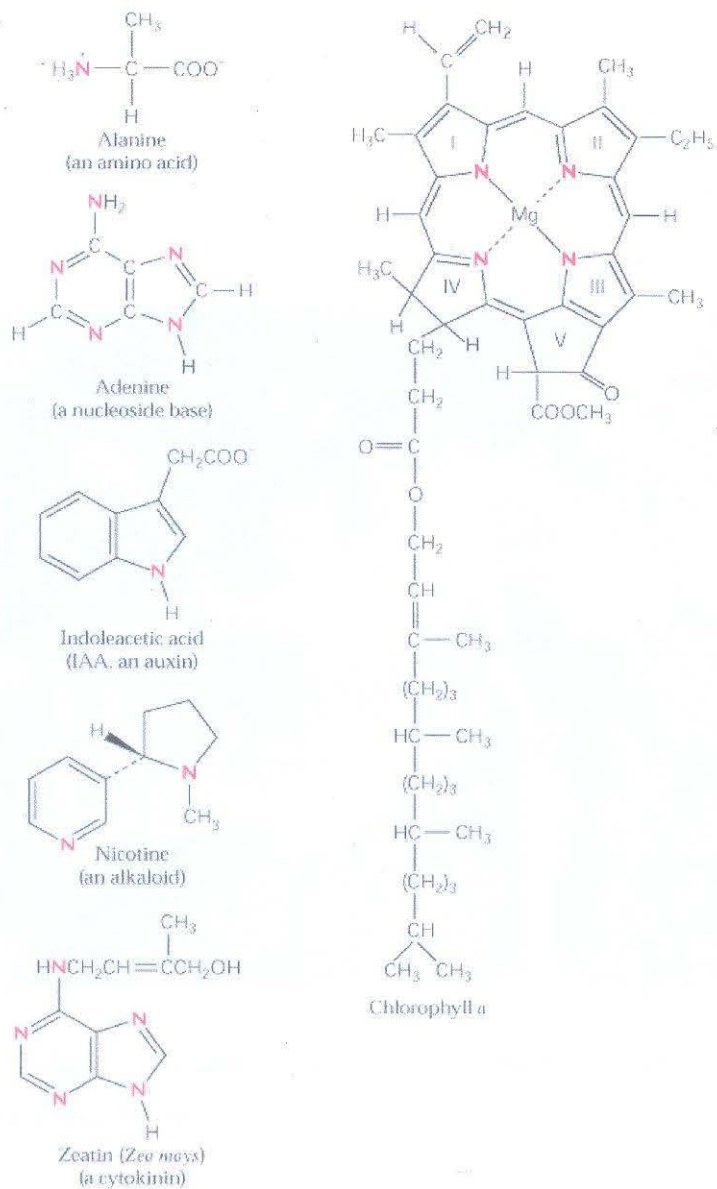
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Fixação biológica do nitrogênio

O nitrogênio é o quarto elemento mais abundante em organismos vivos. Constitui menos de 0,1% da crosta terrestre, mas é o principal constituinte da atmosfera (aproximadamente 80%), principalmente na sua forma molecular ( $N_2$ ). Apesar dessa diferença no conteúdo, a grande massa da crosta terrestre faz com que o número de átomos de nitrogênio, abaixo da terra, seja aproximadamente 50 vezes maior quando comparado com a atmosfera (BUCHANAN, 2000).

Sua distribuição é farta na matéria biológica, participando da constituição de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormônios vegetais, bem como de muitas outras moléculas que desempenham papéis fundamentais no metabolismo (figura 1). Esta ampla distribuição se deve à propriedade do nitrogênio de formar facilmente fortes ligações covalentes por compartilhamento de um ou mais pares de elétrons, originando estruturas estáveis e de grande variabilidade (LEHNINGER, 1976). Na verdade, estas características são atribuídas unicamente ao nitrogênio na forma reduzida, já que o nitrogênio na forma molecular não está quimicamente disponível, necessitando de alta quantidade de energia de ativação para o rompimento da ligação tripla estável entre os dois átomos da molécula. Justamente este nitrogênio atmosférico é a constante fonte do elemento para os sistemas biológicos. Ocorre, portanto, a necessidade de uma pré-elaboração do nitrogênio para torná-lo quimicamente reativo, podendo, desta forma, ser incorporado e participar da formação de uma grande diversidade de estruturas biológicas. Um destes procedimentos denomina-se fixação biológica do nitrogênio, que consiste na redução do nitrogênio molecular, transformando-o em compostos quimicamente reativos como a amônia ( $NH_3$ ), por exemplo. Este processo é realizado por microrganismos especialmente adaptados, tais como as bactérias diazotróficas. A amônia é incorporada ao metabolismo destas bactérias sob a forma de glutamato e glutamina, que irão doar este nitrogênio reduzido a todas as rotas biossintéticas de compostos que contenham nitrogênio (STRYER, 1992).

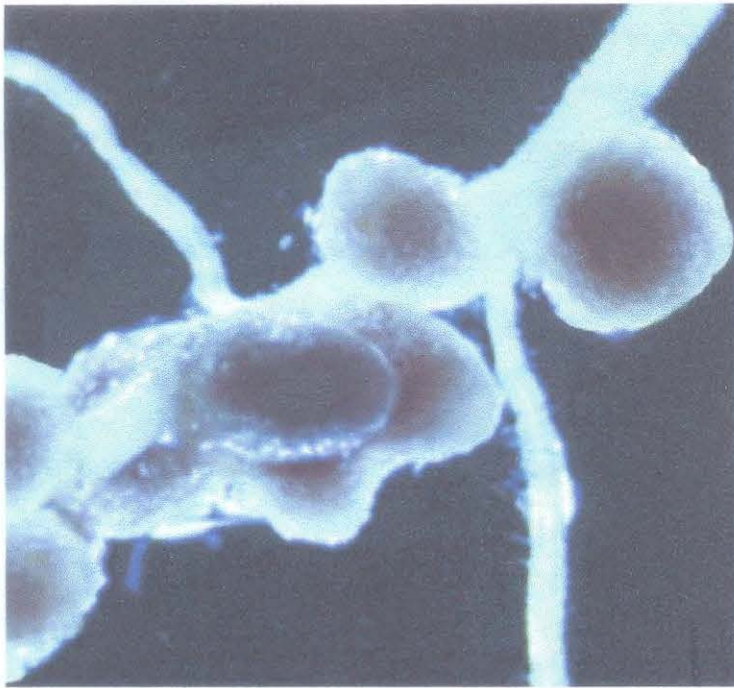




**Figura 1: Compostos nitrogenados de importância biológica (retirado de BUCHANAN, 2000).**

As bactérias diazotróficas encontram-se em vida livre no solo ou em associação com raízes de plantas, formando, por exemplo, os nódulos radiculares (figura 2). O vegetal pode se beneficiar indiretamente desta fonte de nitrogênio fixado, seja na forma simbiótica ou obtida do solo, incorporando este nitrogênio ao seu metabolismo. Como parte da cadeia alimentar, as plantas repassarão os compostos nitrogenados para outros microrganismos ou animais que dela se alimentarão. Assim, todos os seres vivos obtêm o seu nitrogênio a

partir da redução deste composto, efetivada pelas bactérias diazotróficas (ATLAS & BARTHA, 1981).



**Figura 2: Nódulos radiculares em uma leguminosa (retirado de BUCHANAN, 2000), onde ocorre a fixação biológica do nitrogênio.**

Em contraste com estes processos naturais, existe a produção industrial de fertilizantes nitrogenados, onde o nitrogênio molecular é convertido em amônia pelo processo de Haber-Bosch com emprego de temperaturas de 300-500°C e altos níveis de pressão (entre 200 e 600 atm), com grandes gastos de energia (KIM & REES, 1994). Assim, atualmente, o interesse no estudo genético da fixação do nitrogênio assume grande importância, em função da possibilidade de utilização de bactérias diazotróficas em substituição aos fertilizantes usuais, possibilitando diminuição de custos, incremento na produção agrícola e elaboração de alternativas para suprir a demanda cada vez mais crescente de alimentos no mundo (PEDROSA, 1987).

## 1.2 *Azospirillum brasilense* Sp7

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem ao grupo de bactérias gram-negativas, com a forma de bastonete e usualmente flageladas. Seu metabolismo é aeróbico, embora a fixação do nitrogênio ocorra em ambiente microaeróbico. São conhecidas por fixar nitrogênio tanto em vida livre no solo como em associação com raízes de diversas gramíneas, incluindo culturas economicamente importantes como milho, arroz e trigo (TARRAND *et al.*, 1978). Apresentam um metabolismo de C e N muito versátil, tornando-as muito bem adaptadas ao competitivo ambiente da rizosfera. Amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular podem servir como fontes de nitrogênio (HARTMANN & ZIMMER, 1994). *Azospirillum brasilense* pode utilizar como fonte de carbono o malato, piruvato e succinato, além de ter preferência por frutose em detrimento de glicose (TARRAND *et al.*, 1978; DÖBEREINER *et al.*, 1992). Em condições desfavoráveis, como dissecação e limitação de nutrientes, as bactérias do gênero *Azospirillum* podem se converter em forma de cisto (LAMM & NEYRA, 1981; SADASIVAN & MEYRA, 1985; SADASIVAN & NEYRA, 1987). Esta mudança morfológica é acompanhada pelo desenvolvimento de uma vesícula externa de polissacarídeos e pela acumulação de grânulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), que podem servir como fonte de C e energia sob condições de estresse (TAL & OKON, 1985; TAL *et al.*, 1990).

Apesar da quantidade considerável de dados experimentais existentes relativos a *A. brasilense*, como seus efeitos sobre o desenvolvimento vegetal, o modo exato de ação pelo qual *Azospirillum* estimula o crescimento das plantas às quais se associa ainda não é totalmente compreendido (GLICK, 1995; VANDE BROEK & VANDERLEYDEN, 1995). O crescimento observado nas plantas após a inoculação foi demonstrado a campo (BALDANI *et al.*, 1987) e em experimentos em casas de vegetação (GASKINS *et al.*, 1977). Este efeito estimulatório vêm sendo atribuído a diversos mecanismos, incluindo a fixação biológica do nitrogênio (VON BULOW & DÖBEREINER, 1975; SMITH *et al.*, 1976) e a produção de auxina (TIEN *et al.*, 1979). Entretanto, a contribuição da fixação biológica do nitrogênio é freqüentemente questionada (PATRIQUIN *et al.*, 1983; BODDEY *et al.*, 1986; BARBIERI *et al.*, 1986; BASHAN *et al.*, 1989; FAGES, 1994),

sendo um dos motivos a excreção de pequenas quantidades de amônia durante o processo de fixação. Portanto, outros fatores, como a produção de substâncias que promovem o crescimento vegetal (UMALI-GARCIA *et al.*, 1980) e aumento na taxa de absorção de minerais pelas raízes (LIN *et al.*, 1983) vêm sendo considerados para explicar o crescimento vegetal e poderiam ser até mais importantes na estabilização da resposta. Após a inoculação com *Azospirillum*, é verificado um aumento no número de raízes laterais e de pêlos radiculares, aumentando a superfície de contato com o solo e permitindo uma maior captação de nutrientes e água (SARIG *et al.*, 1988). Diferentemente da simbiose rizóbio-legume, a associação de *Azospirillum* com raízes de plantas não resulta na formação de uma estrutura de fácil detecção (nódulos radiculares – figura 2). Sítios precisos de associação com a raiz não são visíveis e o isolamento e análise de mutantes permanece difícil (VANDE BROEK *et al.*, 1993). Dessa forma, os mecanismos de interação e estimulação do crescimento vegetal por *Azospirillum* ainda são pouco entendidos.

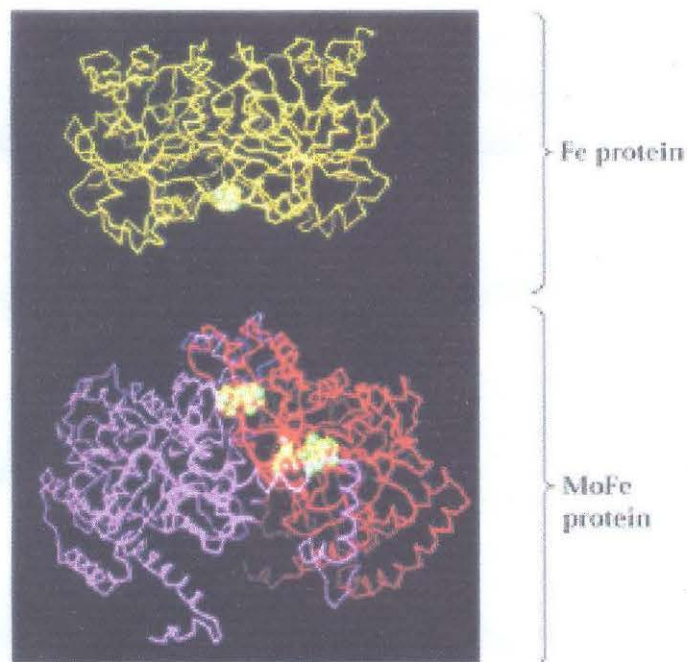
O gênero *Azospirillum* tem uma distribuição bastante ampla na superfície da terra, atingindo, principalmente, solos de clima tropical e temperado (PATRIQUIN *et al.*, 1983).

Além da espécie *A. brasilense* (para recente revisão ver STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000), o gênero *Azospirillum* compreende também outras espécies, tais como: *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* e *A. irakense* (TARRAND *et al.*, 1978; MAGALHÃES *et al.*, 1983; REINHOLD *et al.*, 1987; KHAMMAS *et al.*, 1989; FANI *et al.*, 1995).

### 1.3 Bioquímica da fixação do nitrogênio

O processo de fixação biológica do nitrogênio é realizado por organismos procarióticos através do complexo enzimático chamado nitrogenase. Este complexo é formado por duas enzimas, a dinitrogenase e a dinitrogenase redutase (figura 3). A dinitrogenase é um heterotetrâmero de 240 KDa capaz de se ligar ao N<sub>2</sub>, realizando sua fixação durante a redução. A dinitrogenase redutase, um homodímero de 64 KDa, abastece a dinitrogenase com elétrons provenientes de outras rotas metabólicas. A dinitrogenase, também chamada de FeMo-proteína, possui dois cofatores ancorados: o “P cluster” (Fe<sub>8</sub>S<sub>7</sub>)

e um cofator-FeMo ( $\text{Fe}_2\text{S}_9\text{Mo}$ :homocitrato). A dinitrogenase redutase, também chamada de Fe-proteína, possui um centro  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  (MORTENSON, 1979; PASSAGLIA *et al.*, 1991; BUCHANAN, 2000; POTRICH *et al.*, 2001).



**Figura 3: Estrutura tridimensional dos componentes menor (Fe-proteína) e maior (FeMo-proteína) da nitrogenase (retirado de BUCHANAN, 2000).**

O processo de catálise realizado pela nitrogenase inicia com o aporte de elétrons oriundos de agentes, tais como ferredoxinas ou flavodoxinas, que irão reduzir o componente Fe-proteína no seu centro  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ . Os elétrons são, então, repassados para o centro P do componente FeMo-proteína, que os transfere para o FeMo-cofator, onde ocorre a redução do nitrogênio (DEAN *et al.*, 1993; HOWARD & REES, 1994; PETERS *et al.*, 1995). Para cada molécula de nitrogênio reduzida é necessário o aporte de 8 elétrons e a hidrólise de 16 moléculas de ATP (figura 4).



**Figura 4: Estequiometria da reação de fixação do nitrogênio.**

## 1.4 Genética da fixação do nitrogênio

A bactéria diazotrófica *Klebsiella pneumoniae* possui a organização genética da fixação do nitrogênio melhor estudada até o momento. Os genes de fixação encontram-se agrupados em uma região cromossômica abrangendo 24.206 pares de bases (ARNOLD *et al.*, 1988), onde estão dispostos 20 genes, denominados *nif*, organizados em 8 operons: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*, conforme mostrado na figura 5.

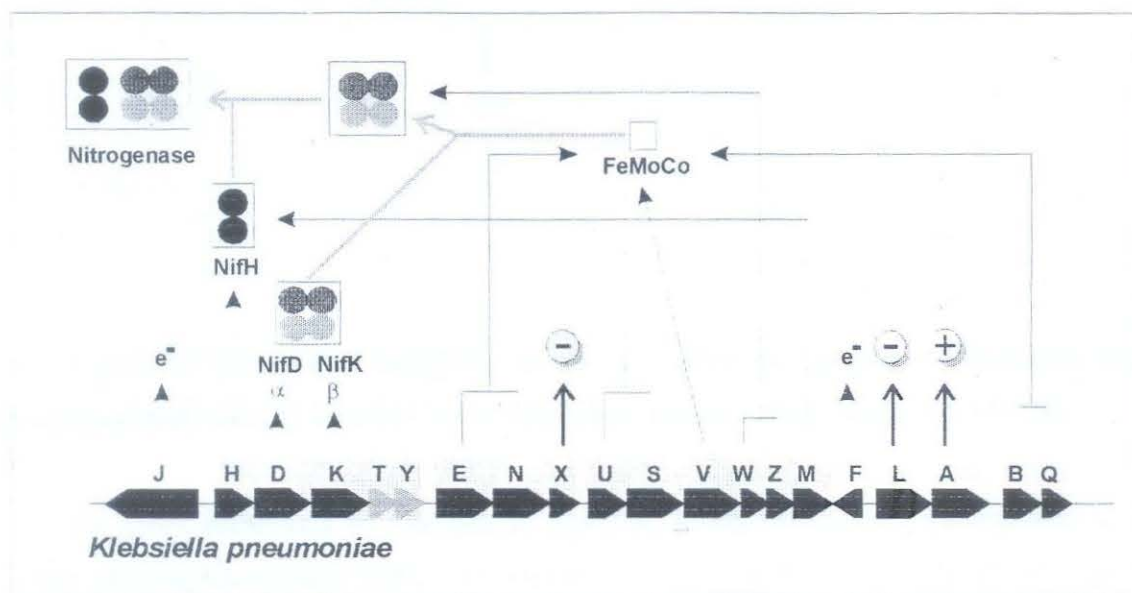
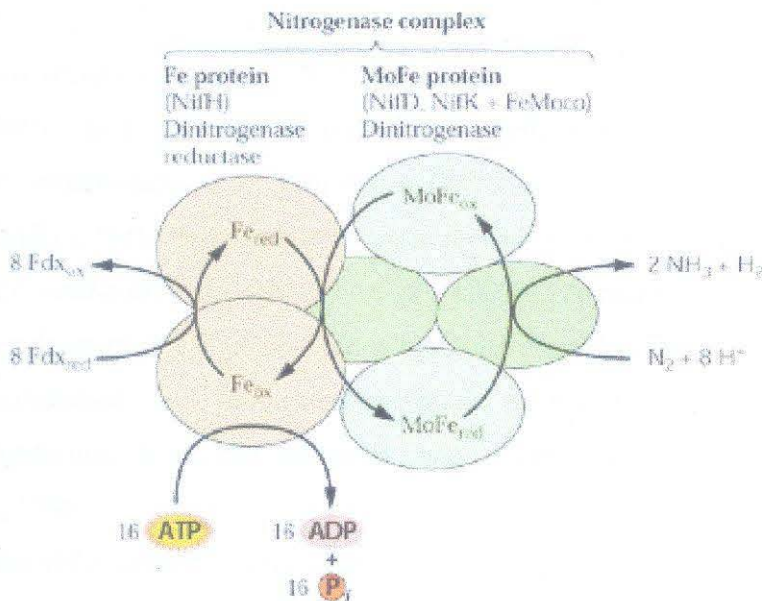


Figura 5: Região genômica de *Klebsiella pneumoniae* contendo seqüências envolvidas na fixação do nitrogênio e sua função no processo.

Dentre estes, destacam-se os genes *nifHDK*, responsáveis pela codificação do complexo nitrogenase, sendo que o gene *nifH* codifica o componente menor (Fe-proteína), e os genes *nifD* e *nifK* codificam as sub-unidades  $\alpha$  e  $\beta$  do componente maior (FeMo-proteína), conforme esquematizado nas figuras 5 e 6, a qual também apresenta as reações de transferência de elétrons e hidrólise de ATP que ocorrem durante a conversão do  $N_2$  à amônia.



**Figura 6: Genes que codificam as sub-unidades do complexo enzimático da Nitrogenase (retirado de BUCHANAN, 2000) e as reações bioquímicas envolvidas.**

Os genes estruturais da nitrogenase, *nifHDK*, foram isolados e caracterizados em diversos gêneros bacterianos, como, por exemplo, *Rhizobium meliloti* (BANFALVI *et al.*, 1981), *Bradyrhizobium japonicum* (THÖNY & HENNECKE, 1984), *Azotobacter chroococcum* (JONES *et al.*, 1984), *Rhodobacter capsulatus* (AHOMBO *et al.*, 1986) e *Azospirillum brasilense* (QUIVIGER *et al.*, 1982; SCHRANK *et al.*, 1987). Em *K. pneumoniae* foi demonstrado que os produtos dos genes estruturais da nitrogenase não são inicialmente ativos, necessitando o seu processamento por um conjunto de outros produtos de genes *nif*.

Os produtos dos genes *nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifH*, *nifQ* e *nifV* desempenham a função de síntese do FeMo-cofator, centro ativo da redução do nitrogênio na nitrogenase, sendo os 4 primeiros absolutamente essenciais (PAUL & MERRICK, 1989). O gene *nifV* codifica uma homocitrato sintase, ao passo que o produto do gene *nifQ* está envolvido na mobilização do ferro, molibdênio e enxofre durante a montagem do grupo FeMo-cofator (DEAN *et al.*,

1993). A inserção deste cofator depende da estabilização da dinitrogenase, conferida pelo produto do gene *nifY* (HOMER *et al.*, 1993), existindo, ainda, a necessidade de outros genes que estão relacionados com a FeMo-proteína, como *nifW*, *nifZ* e *nifT* (PAUL & MERRICK, 1989). Em *K. pneumoniae*, o produto do gene *nifM* está diretamente implicado na ativação e estabilização da Fe-proteína (HOWARD *et al.*, 1986), podendo os polipeptídeos NifU e NifS agirem também neste mesmo componente, como foi verificado em *Azotobacter vinelandii* (JACOBSON *et al.*, 1989b). A manutenção da atividade da enzima é conferida pelos produtos dos genes *nifJ*, uma flavodoxina, e *nifF*, uma piruvato-flavodoxina oxireductase. Tais proteínas têm função de transferência de elétrons para a nitrogenase, conferindo à enzima potencial redutor para sua catálise (DIXON, 1984; GUSSIN *et al.*, 1986).

O operon *nifLA* contém 2 genes cujos produtos regulam a expressão coordenada de todos os demais genes *nif* (DIXON *et al.*, 1980). A proteína NifA é responsável pela ativação dos demais genes *nif*, enquanto que o polipeptídeo NifL reprime todo o processo por ligar-se à proteína NifA, impedindo que esta exerça sua função estimulatória (HILL *et al.*, 1981). O produto do gene *nifX* também tem ação reguladora, pois, em condições de alta concentração de amônia e oxigênio no meio, tende a reprimir a expressão dos demais genes (GOSINK *et al.*, 1990).

A organização dos genes envolvidos no processo de fixação do nitrogênio em *K. pneumoniae* em agrupamentos de operons *nif*, consiste de um modelo estrutural que apresenta muitas similaridades em outros gêneros diazotróficos, tais como: *Rhizobium* (AGUILAR *et al.*, 1987), *Bradyrhizobium* (EBELING *et al.*, 1987), *Azotobacter* (JACOBSON *et al.*, 1989a), *Rhodobacter* (HASELKORN *et al.*, 1986) e *Anabaena* (HASELKORN *et al.*, 1987).

### **1.5 Estrutura dos genes envolvidos no processo de fixação do nitrogênio em *Azospirillum brasilense* Sp7**

Com o objetivo de correlacionar a estrutura da organização dos genes envolvidos no processo de fixação do nitrogênio de *A. brasilense* Sp7 com àquela de *Klebsiella*



*pneumoniae*, foram realizados experimentos de hibridização heteróloga com sondas contendo os genes *nifHDK* de *K. pneumoniae* e o DNA total de *A. brasilense* Sp7 (QUIVIGER *et al.*, 1982; SCHRANK *et al.*, 1987). Verificou-se que os genes estruturais da nitrogenase situavam-se em um segmento *EcoRI* de 6,5 Kb. O seqüenciamento desta região revelou a disposição dos genes estruturais da nitrogenase em um único operon *nifHDKORFIY*, semelhante ao operon *nifHDKTY* encontrado em *K. pneumoniae*, diferindo somente na *ORF1*, cuja seqüência de nucleotídeos não apresentou homologia com a seqüência do gene *nifT* desta última bactéria (PASSAGLIA *et al.*, 1991).

Após a localização deste operon, os esforços se voltaram às regiões adjacentes. Assim, através de técnicas de hibridização heteróloga e mutagênese sítio-direcionada, foram sendo localizados e caracterizados os demais genes *nif* que compõem o agrupamento de fixação do nitrogênio em *A. brasilense* Sp7. O gene *nifE* foi localizado em uma região posicionada a 4 Kb distante do gene *nifK* (GALIMAND *et al.*, 1989), sendo, mais tarde, associado a outros genes transcritos em um único operon *nifENXORF3ORF5fdxAnifQ* (POTRICH, 1997; POTRICH *et al.*, 2001). Em outra região, a 9 Kb de distância de *nifK*, foram localizados os genes homólogos aos genes *nifUS* (GALIMAND *et al.*, 1989), sendo este operon, posteriormente, seqüenciado e estruturado em uma unidade de transcrição composta pelos genes *ORF2nifUSVORF4* (FRAZZON, 1996; FRAZZON & SCHRANK, 1998). À jusante deste operon encontram-se o gene *nifW*, seqüenciado por MILLCAMPS *et al.*, 1993, e o operon *fixABCX*, a uma distância de aproximadamente 12 Kb do gene *nifK* (GALIMAND *et al.*, 1989; GROSS, 1999). O agrupamento de fixação do nitrogênio de *A. brasilense* é completado pelos genes *draTG*, localizados à montante do operon *nifHDKORFIY*. Estes genes participam de processos de regulação posteriores à tradução da nitrogenase (FU *et al.*, 1989).

Além destes genes, muitos outros estão implicados direta ou indiretamente na fixação do nitrogênio, não estando, porém, localizados no agrupamento principal dos genes ligados ao processo de fixação do nitrogênio em *A. brasilense* Sp7. Dentre estes se destaca o gene regulador *nifA*, que é cotranscrito com *nifB* em um único operon (LIANG *et al.*, 1991). A figura 7 mostra a região de cerca de 30 Kb correspondente ao agrupamento principal de fixação do nitrogênio em *A. brasilense* Sp7.



**Figura 7:** Região genômica de *Azospirillum brasilense* contendo sequências envolvidas no processo de fixação do nitrogênio.

### 1.6 Regulação da fixação do nitrogênio

A análise dos processos de regulação da fixação biológica do nitrogênio também utilizou como modelo a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Existem vários níveis de regulação, sendo o mais amplo, também chamado de controle global do nitrogênio, exercido por 4 enzimas: uma uridiltransferase, codificada pelo gene *glnD*; uma proteína trimérica denominada PII, codificada pelo gene *glnB*; uma proteína histidina quinase, NtrB, e uma proteína capaz de se ligar ao DNA, chamada NtrC. A função destes componentes é monitorar a concentração intracelular do nitrogênio fixado. Quando existe deficiência de nitrogênio, os sistemas de assimilação são impulsionados; quando ocorre superávit na produção de nitrogênio fixado, estes mecanismos são reprimidos.

A assimilação primária do nitrogênio apresenta o seguinte mecanismo: a amônia, formada na fixação do nitrogênio, é englobada ao metabolismo pela ação sequencial das enzimas: glutamato desidrogenase, que incorpora a amônia ao acceptor 2-cetoglutarato (2KG); glutamina sintetase (GS), que converte o glutamato em glutamina, proporcionando nova assimilação de amônia; e glutamato sintase (GOGAT), que promove a aminação redutiva do 2KG, formando novas moléculas de glutamato a partir da glutamina. O glutamato e a glutamina servem, então, como carreadores de nitrogênio para todas as rotas metabólicas que utilizam este elemento (formação de purinas, pirimidinas, porfirinas, aminoácidos, proteínas, entre outras). Por ser o produto final da incorporação da amônia, a glutamina, quando em alta concentração, serve como índice da quantidade de nitrogênio

disponível para o sistema. Por outro lado, a abundância de 2KG reflete a deficiência de nitrogênio fixado na célula.

O sistema de 4 enzimas do controle global, descrito anteriormente, está relacionado à percepção da quantidade de nitrogênio disponível. A enzima que realmente detecta a variação na relação de concentração Glutamina/2KG é a uridiltransferase (UTase). Com baixo nível de nitrogênio e grande quantidade de ATP nas células, a UTase modifica covalentemente PII pela adição de 3 moléculas de UMP, uma em cada sub-unidade. A proteína PII-3UMP não interage com o componente NtrB que, livre, se auto-fosforila, transferindo seu grupo fosforil (Pi) posteriormente para NtrC. NtrC-Pi tem a capacidade de ligar-se ao DNA, ativando o sistema de genes responsáveis pela fixação do nitrogênio e possibilitando a incorporação deste componente até então em estado de escassez na célula.

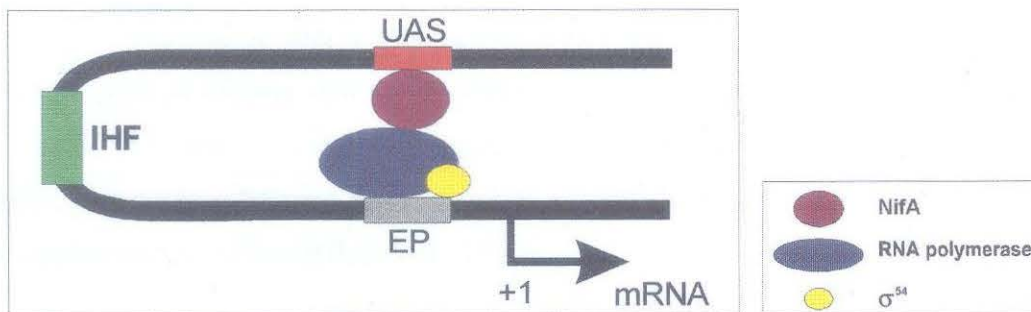
Ao mesmo tempo em que a amônia é formada pelos produtos protéicos destes genes recém ativados, PII-3UMP aciona uma adeniltransferase (ATase) que irá deadenilar a glutamina sintetase tornando esta ativa, incorporando a amônia produzida pelo sistema de fixação do nitrogênio recém estimulado por NtrC-Pi, que também exerce sua ação estimulatória sobre outros operons envolvidos na formação de aminoácidos nitrogenados como a histidina (*hut*), prolina (*put*), arginina (*arg*). Assim, todo este nitrogênio recém fixado pode ser incorporado e distribuído sob a forma de glutamina para as rotas biossintéticas que, agora, também vão se encontrar disponíveis para a utilização do nitrogênio.

Em caso de alta concentração de nitrogênio fixado, quando ocorre abundância de glutamina, a UTase catalisa a remoção das moléculas de UMP da proteína PII. Esta, na sua forma deuridilada e estimulada por 2KG, vai interagir com NtrB, promovendo a sua atividade de fosfatase. NtrB catalisa a defosforilação de NtrC, fazendo com que este último componente não mais realize sua função de ativar diferentes operons. PII deuridilada também promove a adenilação da glutamina sintetase tornando-a inativa para a incorporação de mais amônia. Finalmente, através da ação destas enzimas, todo o sistema assimilatório do nitrogênio é paralisado (GUSSIN *et al.*, 1986; EDWARDS & MERRICK, 1995; MERRICK & EDWARDS, 1995).

Um segundo nível de controle da expressão dos genes responsáveis pela fixação do nitrogênio está relacionado à transcrição destes. Em muitos operons, como, por exemplo, da

histidina (*hut*) e prolina (*put*), pertencentes ao processo de assimilação do nitrogênio, o reconhecimento do promotor é realizado por um fator sigma alternativo,  $\sigma^{54}$ , codificado pelo gene *rpoN*, que tem afinidade por seqüências consenso -24(GG)/-12(GC). O mesmo acontece com os operons relacionados à fixação do nitrogênio em *K. pneumoniae*, que também possuem esta seqüência consenso em suas regiões reguladoras. Esta característica dá uniformidade de transcrição aos operons do sistema global do nitrogênio, em relação à variação nas concentrações deste elemento na bactéria. Portanto, quando o nível de amônia na célula está baixo, todos os genes de fixação e assimilação de nitrogênio vão ser reconhecidos pela sub-unidade  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase que, na sua forma de holoenzima, irá ativar concomitantemente estes genes (GUSSIN *et al.*, 1986).

A RNA-polimerase complexada com  $\sigma^{54}$  é incapaz de promover uma transcrição eficiente da maioria dos genes de fixação do nitrogênio. Existe a necessidade da estimulação por uma proteína ativadora do sistema, codificada pelo gene *nifA*. Quando o nível de nitrogênio fixado encontra-se baixo, uma cascata regulatória envolvendo 4 enzimas, como foi explicado anteriormente, transmite um sinal de estímulo para que a fixação do nitrogênio ocorra. NtrC, como último componente desta cascata, liga-se a uma região de DNA situada à montante do gene *nifA*, ativando a transcrição deste. O produto de *nifA* ancora-se a seqüências consenso TGT-N<sub>10</sub>-ACA, localizadas a 100 ou mais pares de bases do início da transcrição, denominadas UAS's (seqüências ativadoras à montante, do inglês *upstream activator sequences*), presentes em todos os operons *nif* de *K. pneumoniae*, exceto o *nifLA*. A proteína NifA, quando ligada à seqüência UAS, através de sua região carboxi-terminal, interage com a RNA-polimerase complexada com o fator  $\sigma^{54}$ , através da formação de uma alça mediada pelo Fator de Integração ao Hospedeiro, ou IHF (HOOVER *et al.*, 1990; SANTERO *et al.*, 1992), conforme mostrado na figura 8. O complexo assim formado permite a perfeita orientação da RNA-polimerase, possibilitando a transcrição eficiente dos genes. Este sistema de ativação pela proteína reguladora NifA permite a expressão coordenada dos operons relacionados à fixação do nitrogênio frente a uma demanda requerida pela baixa concentração de amônia na célula. Este constitui um terceiro nível de controle da fixação do nitrogênio na bactéria (AUSUBEL, 1984; GUSSIN *et al.*, 1986).



**Figura 8: Ativação da transcrição dos genes *nif* através de NifA.**

EP= elemento promotor; UAS= upstream activator sequence; IHF=fator de integração ao hospedeiro.

Outro aspecto em relação à fixação do nitrogênio é que esta somente ocorre em baixas tensões de oxigênio. O processo de fixação do nitrogênio é um mecanismo complexo de transferência de elétrons de um substrato biológico para um aceptor, que é o nitrogênio molecular. Este é um processo desfavorável, tendo em vista que o nitrogênio possui fraco poder oxidante. Logo, é necessária toda uma maquinaria enzimática, alimentada com energia livre proveniente do ATP, para que isto ocorra. O oxigênio, um excelente aceptor de elétrons, funciona como um competidor, inibindo o fluxo de elétrons para o nitrogênio. A presença de O<sub>2</sub> induz danos oxidativos irreversíveis aos centros metálicos, tanto do complexo nitrogenase, como de transportadores de elétrons, além da oxidação de dissulfetos fundamentais para a estruturação de proteínas do sistema. Portanto, a fixação do nitrogênio é ajustada para funcionar em baixas tensões de oxigênio (ROBSON & POSTGATE, 1980; HILL, 1988). *K. pneumoniae* consegue tal regulação através da ação da proteína NifL que, tanto na presença de oxigênio, como em altas concentrações de nitrogênio fixado, inibe NifA por interação direta com esta proteína. O gene *nifL* é cotranscrito com *nifA*, existindo, portanto, em concentrações iguais a da proteína reguladora, o que garante a desativação imediata do sistema, em caso de aumento nos níveis de oxigênio (AUSTIN *et al.*, 1990; BERGER *et al.*, 1994).

Esta aversão ao oxigênio contrasta com a necessidade de grandes suprimentos de energia, que somente são garantidos através de um metabolismo respiratório que demanda quantidades de oxigênio adequadas para que este processo aconteça. Assim, a fixação do

nitrogênio tem de coexistir com a presença do oxigênio dentro de níveis ideais para que ocorra a formação de amônia sem comprometimento do sistema (HILL, 1988; MYLONA *et al.*, 1995). Existem mecanismos específicos de proteção respiratória para cada organismo, garantindo o balanço entre as baixas tensões de oxigênio durante a fixação do N<sub>2</sub> e o metabolismo aeróbico (HILL *et al.*, 1990).

### 1.6.1 Regulação da fixação do nitrogênio em *Azospirillum brasilense* Sp7

*Azospirillum brasilense* Sp7 possui muitos aspectos em comum com os mecanismos de regulação da fixação do nitrogênio presentes em *Klebsiella pneumoniae*, assim como algumas variações importantes.

No controle global, sabe-se que a integridade dos genes *glnA*, que codifica a glutamina sintetase, e *glnB*, que codifica a PII, são importantes para a fixação do nitrogênio. Em mutantes *glnA*, a expressão de *nifA* é significativamente reduzida (BOZOUKLIAN & ELMERICH, 1986), enquanto que, em mutantes *glnB*, a fixação do nitrogênio não ocorre (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Sabe-se que a proteína NtrC é modulada por fosforilação realizada pelo componente NtrB, mas também observa-se que ela desempenha um papel secundário, não sendo o principal ativador da expressão de *nifA*. A expressão de *nifA* em *A. brasilense* é constitutiva, independente das condições de concentração de nitrogênio e oxigênio intercelulares. NtrC somente é importante para a máxima expressão de *nifA* (LIANG *et al.*, 1991; LIANG *et al.*, 1992). O papel regulatório principal parece estar centrado na proteína PII, que teria a capacidade de ativar tanto a fixação do nitrogênio, por ação direta na proteína NifA, como a síntese de glutamina sintetase (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Esta última também, de alguma forma, afeta a expressão do gene *nifA*, pois mutantes *glnA* apresentam fenótipo Nif<sup>-</sup>, que pode ser revertido por complementação com plasmídeos contendo o gene *glnA* (BOZOUKLIAN & ELMERICH, 1986). Portanto, a cascata do sistema global do nitrogênio em *A. brasilense* Sp7 funciona de maneira diferente daquela descrita para *K. pneumoniae*.

O componente PII, como elemento central na modulação em resposta ao status de nitrogênio fixado, atua diretamente sobre a proteína NifA, desreprimindo esta quando a

concentração de amônia na célula é baixa. A proteína NifA de *A. brasilense* é formada por três domínios. O domínio C-terminal contém o motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA; o domínio central interage com o fator sigma 54 da RNA-polimerase; o terceiro domínio, N-terminal, é responsável por manter a proteína em uma forma reprimida. Quando os níveis de nitrogênio fixado encontram-se baixos, o sistema global de regulação envia um sinal por meio da proteína PII uridilada, ou algum componente sob o seu controle, que tem a propriedade de impedir a auto repressão exercida pelo domínio N-terminal da proteína NifA. Assim, NifA, agora na sua forma ativa, pode realizar a estimulação da transcrição dos operons de fixação do nitrogênio (ARSENE *et al.*, 1996; PASSAGLIA *et al.*, 1998).

Da mesma forma como em *K. pneumoniae*, a fixação do nitrogênio em *A. brasilense* é reprimida em função de altas concentrações de oxigênio. Em *A. brasilense*, onde não ocorre o componente NifL, este mecanismo de inativação é mediado diretamente pela proteína NifA, que detecta a tensão de oxigênio no meio, tornando-se inativa frente à presença deste elemento. Isto se deve à existência de um motivo composto por 4 cisteínas (C-N<sub>11</sub>-C-N<sub>19</sub>-C-N<sub>5</sub>-C) presente em um interdomínio situado entre o domínio central e o N-terminal (ARSENE *et al.*, 1996; PASSAGLIA *et al.*, 1998).

Uma grande diferença na regulação da fixação do nitrogênio entre *A. brasilense* e *K. pneumoniae* é a existência de um sistema de controle posterior à tradução da nitrogenase na primeira bactéria. Este é exercido pelos produtos dos genes *draT* e *draG*, respectivamente uma ADP-ribosil transferase (DRAT) e uma dinitrogenase redutase-ativadora glicohidrolase (DRAG). Em resposta à presença de amônia ou a uma mudança brusca nas condições de anaerobiose, DRAT catalisa a adição de uma molécula de ADP-ribose, provinda de uma molécula de NAD, para um resíduo específico de arginina na sub-unidade do homodímero da dinitrogenase redutase, resultando na inativação da enzima. Por outro lado, em condições favoráveis de fixação do nitrogênio, DRAG retira a molécula de ADP-ribose covalentemente ligada, restaurando a atividade da nitrogenase (ZHANG *et al.*, 1993). Além do sistema DRAT/DRAG, existe ainda outro mecanismo de regulação posterior à tradução da nitrogenase ainda não bem elucidado, o qual inativa a enzima em resposta a altas concentrações de amônia no ambiente celular (ZHANG *et al.*, 1996).

## 1.7 Operon *fixABCX*

Os genes que fazem parte do processo de fixação do nitrogênio e que não possuem homólogos com os genes *nif* conhecidos na bactéria diazotrófica *K. pneumoniae* são chamados de genes *fix*. A caracterização dos genes *fixABCX* foi primeiramente realizada em *Sinorhizobium meliloti*. Nesta bactéria, foi localizado um agrupamento de genes relacionados à fixação de nitrogênio situado em um megaplasmídeo. Ensaios de mutagênese sítio-direcionada com transposon Tn5 e complementação de mutantes incapazes de fixar nitrogênio (Fix<sup>-</sup>) (RUVKUN *et al.*, 1983; ZIMMERMAN *et al.*, 1983), permitiram a verificação da existência de 2 unidades transcricionais, adjacentes ao locus que codifica a nitrogenase, igualmente envolvidas na fixação do nitrogênio. Uma delas, localizada 1,6 Kb à jusante dos genes estruturais, com uma extensão de cerca de 4,2 Kb, revelou, por inativações insercionais com Tn5, o fenótipo Fix<sup>-</sup>. Este fenótipo foi revertido através da complementação com um plasmídeo contendo o gene intacto, mostrando ser esta unidade transcricional essencial para o processo de fixação de nitrogênio na bactéria (RUVKUN *et al.*, 1983). Esta região foi seqüenciada, revelando a presença de 3 novos genes que não mostraram homologia com os genes *nif* de *K. pneumoniae*, sendo denominados de *fixABC*. Um quarto gene foi identificado e denominado *fixX*, sendo localizado adjacientemente ao gene *fixC* (DUSHA *et al.*, 1987). O gene *fixX* foi seqüenciado e verificou-se que faz parte do operon, formando todos os 4 genes uma única unidade de transcrição, *fixABCX*. Os polipeptídeos resultantes das seqüências mostraram tamanho e massa variados: 31 KDa para FixA, 37,7 KDa para FixB, 47,3 KDa para FixC e 10,9 KDa para FixX (EARL *et al.*, 1987).

Os genes *fixABCX* de *Sinorhizobium meliloti* foram utilizados como sonda para a identificação de genes homólogos em *Bradyrhizobium japonicum*. Os resultados dos experimentos posicionaram os genes *fixABCX* separadamente, com *fixBC* estando situados a 2,8 Kb de *nifH* e *fixA* encontrando-se isolado dos outros dois genes (FUHRMANN *et al.*, 1985; GUBLER & HENNECKE, 1988). Estes genes mostraram-se essenciais para a fixação do nitrogênio, em condições de simbiose e de vida livre em ambiente microaeróbico, através de experimentos de mutagênese em sítio-direcionado com Tn5.



Mais tarde, foi identificado o gene *fixX*, também considerado essencial para o processo de fixação do nitrogênio. Este foi situado posteriormente aos genes *fixBC*, formando o operon *fixBCX*. Também foi identificada uma ORF codificando 35 aminoácidos, precedendo o operon *fixBCX*, estando o seu produto implicado na estabilização do mRNA *fixBCX*, uma vez que sua deleção reduz a 1/3 a quantidade deste mRNA (GUBLER *et al.*, 1989).

Também em *Azorhizobium caulinodans* ORS571, os genes *fixABC* mostraram, por análises de mutagênese sítio-direcionada com Tn5, serem necessários para a fixação do nitrogênio, tanto em estado de simbiose como em vida livre em condições de microaerofilia e deficiência de amônia (KAMINSKI *et al.*, 1988). O operon foi seqüenciado em 1991, revelando a existência não somente de *fixX*, como também de uma ORF de 69 aminoácidos, ORF1, localizada posteriormente a este último gene e fazendo parte do operon (ARIGONI *et al.*, 1991). Mutações nesta ORF1, não provocaram alterações na capacidade de fixação de nitrogênio (ARIGONI *et al.*, 1992).

Também foram detectadas as presenças de homólogos *fixABCX* em bactérias do gênero *Azotobacter* (EVANS *et al.*, 1988), sendo que em *Azotobacter vinelandii* o operon possui uma estrutura diferenciada, possuindo um gene *fixP* posicionado anteriormente a *fixA*, formando o operon *fixPABCXORF6* (WIENJENS *et al.*, 1992).

Em *Azospirillum brasilense*, a seqüência de nucleotídeos do operon *fixABCX* revelou um alto grau de homologia com os genes *fixABCX* de outras bactérias diazotróficas citadas anteriormente (FOGHER *et al.*, 1985; GROSS, 1999). Ainda, a seqüência de aminoácidos de *FixABCX* apresentou homologia com proteínas transportadoras de elétrons (ETF $\alpha\beta$ -ETFQO), altamente conservadas entre eucariotos e procariotos.

## 1.8 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- Determinação da atividade promotora do operon *fixABCX* de *Azospirillum brasilense*, analisando se sua ativação é dependente da presença da proteína ativadora NifA.

- Análise sobre a possível função das proteínas FixABCX no processo de fixação biológica do nitrogênio, através da comparação com proteínas homólogas cujas funções já foram determinadas, localizando seqüências correspondentes a centros ativos funcionais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos

TABELA 1: Linhagens bacterianas utilizadas

LINHAGEM BACTERIANA	GENÓTIPO	REFERÊNCIA
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup></i> F' <i>[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15</i> Tn10 ( <i>tet<sup>r</sup></i> )]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> MC1061	Δ ( <i>lacIPOZYA</i> ) x74 <i>galU galK</i> <i>strA<sup>r</sup> hsdR<sup>-</sup> Δ(ara, leu)</i>	CASADABAN <i>et al.</i> , 1983

TABELA 2: Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Linhagem Hospedeira	Descrição	Referência
pJG3	XL1-Blue	Ap <sup>r</sup> , pBluescript SK <sup>+</sup> contendo o gene <i>nifW</i> , a região promotora do operon <i>fixABCX</i> , o gene <i>fixA</i> e a região 5'-terminal de <i>fixB</i> de <i>Azospirillum brasilense</i>	GROSS, 1999
pUC18	XL1-Blue	Ap <sup>r</sup>	MESSING, 1983
pMC1403*	MC1061	Ap <sup>r</sup> , pBR322 contendo o operon <i>lacZYA</i> sem a região promotora	CASADABAN <i>et al.</i> , 1983

pUCpfix	XL1-Blue	Ap <sup>r</sup> , pUC18 contendo a região promotora do operon <i>fixABCX</i> de <i>Azospirillum brasilense</i>	Este trabalho
pUCpfixmut	XL1-Blue	Ap <sup>r</sup> , pUC18 contendo a região promotora do operon <i>fixABCX</i> de <i>Azospirillum brasilense</i> com uma mutação no sítio de reconhecimento para o fator $\sigma^{70}$	Este trabalho
pMCpfix	MC1061	Ap <sup>r</sup> , pMC1403 contendo a região promotora do operon <i>fixABCX</i> de <i>Azospirillum brasilense</i>	Este trabalho
pMCpfixmut	MC1061	Ap <sup>r</sup> , pMC1403 contendo a região promotora do operon <i>fixABCX</i> de <i>Azospirillum brasilense</i> com uma mutação no sítio de reconhecimento para o fator $\sigma^{70}$	Este trabalho
pCK3	MC1061	Tc <sup>r</sup> , pRK290 contendo o gene <i>nifA<sup>c</sup></i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KENNEDY & DRUMMOND, 1985
pMCH	MC1061	Ap <sup>r</sup> , pMC1403 contendo a região promotora do operon <i>nifHDK</i> de <i>Azospirillum brasilense</i>	PASSAGLIA <i>et al.</i> , 1995

\*Este plasmídeo está representado na Figura 9.

### 2.1.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados para a multiplicação das bactérias foram LB (Luria-Bertani) líquido e sólido e meio A (utilizado para o ensaio de atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase), preparados de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). Estes meios foram

preparados com água bidestilada, sendo devidamente esterilizados em autoclave à 121°C por 15 minutos.

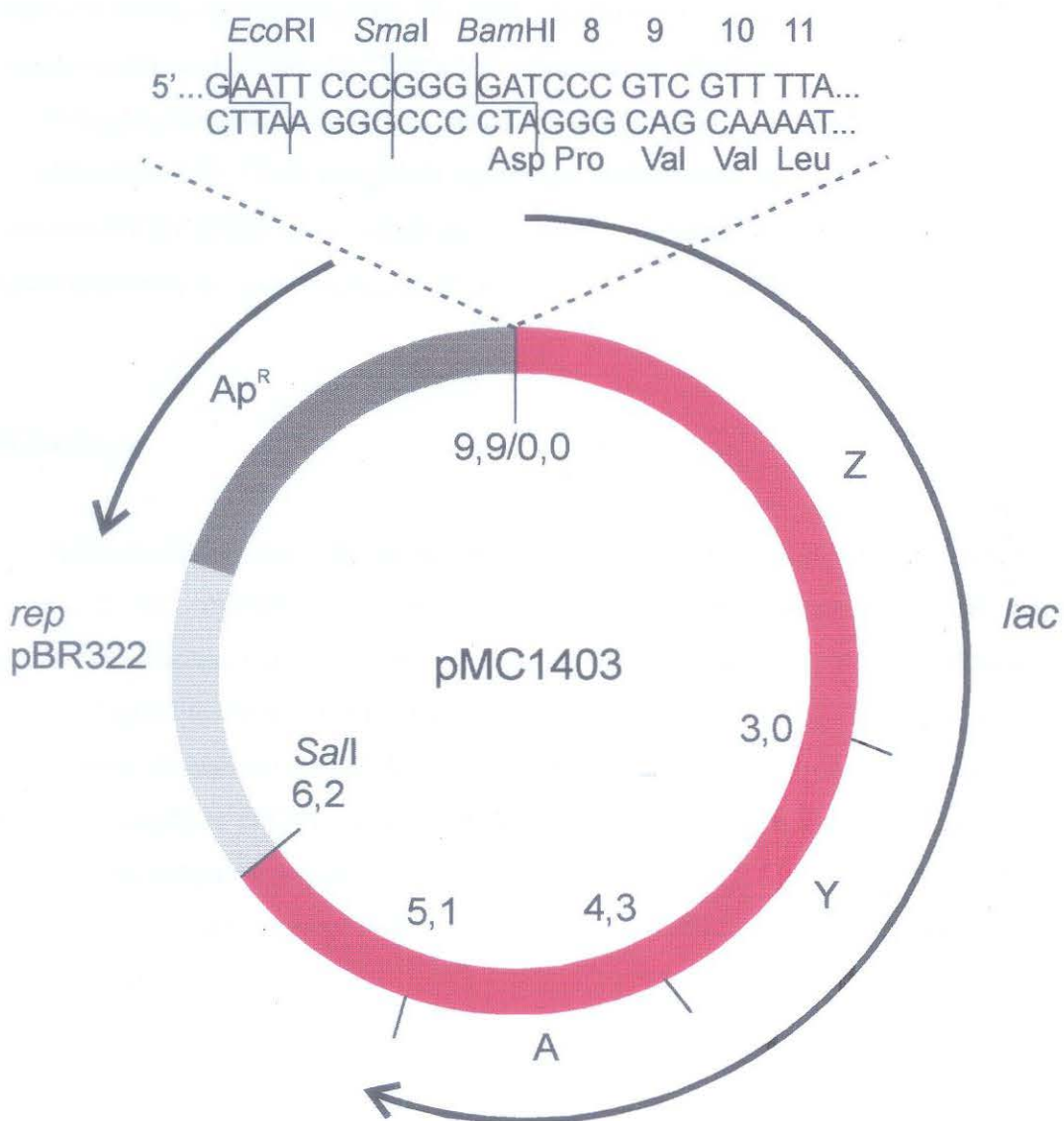


Figura 9: Vetor pMC1403, mostrando o sítio de policlonagem e o operon da lactose sem a região promotora.

### 2.1.3 Antibióticos, soluções, tampões e reagentes

Os antibióticos utilizados foram Ampicilina (concentração final de 100µg/ml) e Tetraciclina (concentração final de 10µg/ml), sendo esterilizados por filtração. Ampicilina foi preparada com água bidestilada e Tetraciclina com etanol absoluto.

Soluções, tampões e reagentes utilizados nas técnicas de extração, clivagem e ligação de DNA, eletroforese de DNA em gel de agarose, transformação bacteriana, reação em cadeia da polimerase (PCR), testes de atividade da enzima β-galactosidase e demais técnicas empregadas, têm suas composições e condições de preparo descritas em SAMBROOK *et al.* (1989).

### 2.1.4 Enzimas

As enzimas de restrição utilizadas nos procedimentos de clivagem de DNA foram as seguintes: *EcoRI*, *BamHI*, *MvaI* e *SmaI*. No processo de preenchimento de extremidades coesivas, foi utilizada a enzima DNA polimerase, fragmento de Klenow. A RNase utilizada nas extrações plasmidiais tem sua preparação e uso orientados em SAMBROOK *et al.* (1989). Nos procedimentos de ligação de DNA foi utilizada a enzima T4 DNA ligase. Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada a enzima termoestável *Taq* DNA polimerase. Estas enzimas foram adquiridas junto à Amersham Biosciences<sup>TM</sup>, Sigma<sup>TM</sup>, MBI Fermentas<sup>TM</sup> e CENBIOT<sup>TM</sup>, sempre seguindo-se as orientações do fabricante. Todas as enzimas foram mantidas à -20°C.

### 2.1.5 Oligonucleotídeos

Para a amplificação de fragmentos específicos de DNA, via PCR, foram utilizados os oligonucleotídeos pfix-up e pfix-do (GROSS, 1999). Foram projetados os oligonucleotídeos pfixmut-up e pfixmut-do, encomendados junto à Gibco BRL<sup>TM</sup>. A seqüência desses oligonucleotídeos encontra-se na tabela abaixo. O local de anelamento encontra-se na figura 11.

**TABELA 3: Oligonucleotídeos utilizados**

<b>PRIMER</b>	<b>SEQÜÊNCIA</b>	<b>LOCAL DE ANELAMENTO</b>
prefix-up	<b>5'-GGCCGTTCCGCTTTCCGGCCATCCAT-3'</b>	ver figura 11
prefix-do	<b>5'-TTGACATTCCGCCGCCTGTC-3'</b>	ver figura 11
prefixmut-up	<b>5'-CTCAACAGCCAGGAAATCAA-3'</b>	ver figura 11
prefixmut-do	<b>5'-TTGATTTCTGGCTGTTGAG-3'</b>	ver figura 11

## **2.2 Procedimentos Experimentais**

### **2.2.1 Amplificação de fragmentos de DNA**

A amplificação de fragmentos específicos de DNA foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), onde todas as etapas, como desnaturação do DNA-molde, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, extensão e terminação, são efetuadas de forma automática em um termociclador do tipo PTC-100 ou PTC-200, adquirido junto à MJ Research<sup>TM</sup>. Foi utilizada a seguinte condição: 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 62°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e 94°C por 45 segundos. Após o término destes ciclos foi realizado um anelamento à 62°C por 2 minutos e extensão da reação à 72°C por 5 minutos.

### **2.2.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Os géis de agarose foram preparados em concentrações que variavam de 0,8% a 1,5%, dependendo das amostras analisadas. Agarose foi dissolvida em TEB 1X, após foi adicionado Brometo de Etídio para uma concentração final de 0,5 µg/ml. Foi realizada eletroforese horizontal em cubas contendo tampão TEB 1X. A visualização dos fragmentos de DNA foi feita em transiluminador de luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda

curto. Quando necessário, com o auxílio de marcadores moleculares específicos, as bandas de DNA desejadas foram cortadas e purificadas.

### **2.2.3 Purificação de fragmentos de DNA**

A purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose ou a partir de solução foi realizada utilizando-se o “kit” comercial de purificação GFX (Amersham Biosciences<sup>TM</sup>).

### **2.2.4 Clivagem de DNA com enzimas de restrição**

Para a obtenção de fragmentos específicos de DNA e preparação de vetores para clonagem, foram realizadas clivagens com enzimas de restrição (seção 2.1.4). As reações de clivagem foram mantidas por 1-2 horas à 37°C.

### **2.2.5 Ligação de DNA**

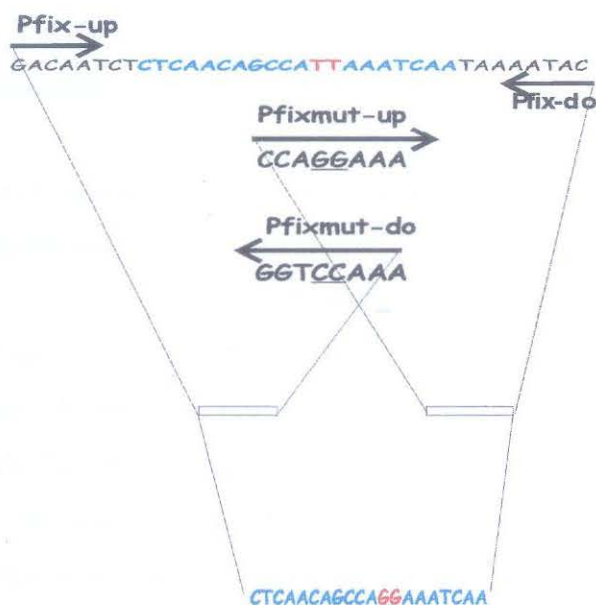
As ligações de fragmentos de DNA aos vetores de clonagem foram realizadas mantendo uma proporção molar de 1:3 entre as concentrações de vetor e fragmento. Quando houve necessidade, as pontas coesivas dos fragmentos foram preenchidas através de reação com DNA polimerase, fragmento de Klenow, gerando extremidades cegas para clonagem. As reações de ligação foram incubadas por 16-18 horas à 16°C.

### **2.2.6 Mutagênese sítio-direcionada**

Para a realização da mutagênese sítio-direcionada, com o objetivo de se obter o fragmento contendo as duas substituições nucleotídicas desejadas, foram realizadas duas



reações em cadeia da polimerase (PCR) tendo como DNA-molde o plasmídeo pJG3 (seção 2.1.1 – figura 10). Foram utilizadas para cada reação 50ng do DNA, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (seção 2.1.4), tampão de reação 10X (CENBIOT™) e 30 pmol dos oligonucleotídeos pfix-up e pfixmut-do em uma reação e os oligonucleotídeos pfix-do e pfixmut-up (seção 2.1.5) na outra reação. Após as PCRs, os produtos amplificados foram purificados (seção 2.2.3) e sua concentração final avaliada em gel de agarose. Nas reações de digestão com a enzima de restrição foram adicionados 1μg dos produtos de PCR e 10U da enzima *MvaI*. As reações foram realizadas paralelamente. Após o período de incubação foi adicionado isopropanol e NaCl (concentração final de 50mM) e o DNA foi precipitado à -20°C por 30 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados e clivados com *MvaI* foram ligados e a reação de ligação foi ressuspensa em 10μl de TE. 1μl da reação foi utilizado em uma PCR utilizando os oligonucleotídeos originais pfix-up e pfix-do.



**Figura 10: Metodologia utilizada na mutagenese sítio-direcionada.**

### 2.2.7 Transformação bacteriana

As transformações bacterianas foram realizadas utilizando-se células competentes de *Escherichia coli* das linhagens MC1061 e XL1-Blue (seção 2.1.1), preparadas de acordo

com os métodos descritos em SAMBROOK *et al.* (1989). A técnica utilizada foi a de transformação por choque térmico e cloreto de cálcio.

Uma alíquota de 100 a 200µl de células competentes foi misturada com o DNA recombinante, obtido após a reação de ligação, e mantida por 30 minutos no gelo. Após a incubação, a mistura foi submetida ao choque térmico (42°C por 2 minutos), seguida de resfriamento no gelo por 5 minutos. Foi adicionado 400µl de LB líquido e as células foram incubadas por 1 hora à 37°C antes de serem plaqueadas em LB sólido. Quando necessário, foi adicionado X-Gal (substrato para a enzima β-galactosidase) na concentração final de 25µg/ml, IPTG (indutor do operon da lactose) na concentração final de 50mM, além dos antibióticos específicos para a seleção dos microrganismos transformantes.

A transformação das ligações do promotor do operon *fixABCX* no vetor pMC1403 foram realizadas na linhagem *E. coli* MC1061 contendo ou não o plasmídeo pCK3.

### 2.2.8 Seleção dos recombinantes

Devido às características específicas dos vetores pUC18 e pMC1403 (seção 2.1.1), o modo de seleção dos recombinantes possui diferenças na análise visual das colônias.

Nas clonagens em pUC18, a primeira seleção foi feita a partir da marca de resistência ao antibiótico Ampicilina existente neste plasmídeo, simplesmente multiplicando as bactérias submetidas à transformação em meio de cultura contendo este antibiótico. A segunda seleção é visual, baseando-se na ocorrência da reação catalisada pela enzima β-galactosidase, que acontece em bactérias transformadas com plasmídeos não-recombinantes. Na presença do indutor IPTG e do substrato cromogênico X-Gal no meio de cultura, toda bactéria contendo pUC18 não-recombinante irá expressar o gene *lacZ*, haverá produção da enzima β-galactosidase, que por sua vez irá converter o composto X-Gal em um produto azulado, conferindo à colônia bacteriana esta mesma cor. Por possuir o sítio de policlonagem no meio do gene *lacZ*, os microrganismos transformados com DNA recombinante não irão expressar a β-galactosidase, visto que o inserto interromperá o gene *lacZ*, ficando essas colônias com uma coloração branca.

O vetor pMC1403 possui o operon da lactose (*lacZYA*) sem a região promotora, com o sítio de policlonagem à montante do gene *lacZ*. Assim, além da seleção feita a partir da marca de resistência à Ampicilina, também é possível uma seleção visual dos transformantes. As bactérias que possuem o vetor pMC1403 com o inserto (no caso o fragmento contendo a região promotora do operon *fixABCX*) produzirão a enzima  $\beta$ -galactosidase, dando às colônias uma coloração azulada. Portanto, a seleção dos recombinantes contendo o fragmento correspondente ao promotor *pfixABCX* foi realizada na presença de Ampicilina, X-Gal e Tetraciclina, marca de resistência do plasmídeo pCK3 (seção 2.1.1), uma vez que se supunha a necessidade da presença da proteína NifA para a ativação do sistema de transcrição. Desta forma pôde-se selecionar recombinantes contendo o plasmídeo pMCpfixmut e o plasmídeo pCK3.

As colônias que apresentaram atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase foram selecionadas para análise. Com o objetivo de eliminar o plasmídeo pCK3, para posterior análise da atividade da região promotora do operon *fixABCX* na ausência e na presença da proteína NifA (expressa pelo plasmídeo pCK3), foram realizados inóculos sucessivos em meio de cultivo sem o antibiótico Tetraciclina.

### 2.2.9 Extração de DNA plasmidial

O método utilizado para a extração de DNA plasmidial em pequena escala foi o da lise alcalina (BIRNBOIM & DOYLY, 1979). A bactéria contendo o DNA de interesse foi multiplicada por 16 horas à 37°C em meio LB contendo os antibióticos apropriados. Aliquotas de 1,5ml das culturas foram centrifugadas em tubos de microcentrífuga, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado bacteriano ressuspenso em 200 $\mu$ l da solução I, contendo 50mM de glicose, 25mM de Tris pH 8,0 e 10mM de EDTA pH 7,5. Após adicionar RNase, a lise celular foi obtida com a adição de 200 $\mu$ l da solução II, contendo NaOH 0,2N e SDS 1%, seguida de precipitação das proteínas e outros componentes celulares com a adição de 200 $\mu$ l da solução III, que corresponde a NaAc 3M pH 5,2. Centrifugando-se por 10 minutos é possível separar estes componentes, deixando o DNA plasmidial no sobrenadante. Esta solução foi precipitada com 1 volume de isopropanol,

seguido de centrifugação a 12000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos, descarte do sobrenadante, lavagem do DNA precipitado com etanol 70% e secagem em estufa. O DNA precipitado foi ressuscitado em 20-50µl de TE. Uma alíquota (10%) da solução foi analisada em gel de agarose. Posteriormente, uma alíquota desta amostra foi digerida com enzimas de restrição para verificar a liberação de fragmento do tamanho esperado.

### 2.2.10 Seqüenciamento de DNA

Para o seqüenciamento de fragmentos específicos de DNA foi utilizado o seqüenciador automático MEGABACE Amersham Biosciences<sup>TM</sup>, seguindo-se as especificações de uso do fabricante.

### 2.2.11 Teste de atividade da β-galactosidase

Para realizar a monitoração da atividade da enzima β-galactosidase foi seguido o protocolo descrito em SAMBROOK *et al.*, 1989. De uma cultura multiplicada por 18 horas em meio A (enriquecido com 0,5% de glicose, 40µg/ml de leucina e 10µg/ml de tiamina, além dos antibióticos apropriados), foi realizada uma diluição de 1:50 no mesmo meio. Esta nova cultura foi mantida à 37°C até atingir a densidade ótica de 0,4 em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nanômetros.

Foram coletadas duas amostras de 500µl, sendo estas congeladas imediatamente. A partir destas amostras foi realizado (em triplicata) o ensaio da β-galactosidase da seguinte maneira: acrescentar aos 500µl da cultura o mesmo volume de tampão Z (0,06M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,04M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,01M de KCl, 0,001M de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,05M de β-mercaptoetanol), 25µl de SDS 0,1% e 50µl de clorofórmio. Misturar no vórtex por 30 segundos e manter à temperatura ambiente por 15 minutos. Retirar 50µl dessa mistura e acrescentar 450µl de tampão Z e 200µl de ONPG 4mg/ml (substrato para a enzima β-galactosidase). O controle negativo foi realizado com 50µl de água bidestilada. Após a adição das amostras nos tubos, estas foram misturadas rapidamente e incubados à

28°C (temperatura em que a enzima  $\beta$ -galactosidase tem sua maior atividade). A partir deste momento foi iniciada a contagem do tempo até o desenvolvimento de uma coloração amarela. A reação foi interrompida com a adição de 250 $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e incubação em gelo por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados e a densidade ótica do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 420 nanômetros. A expressão da  $\beta$ -galactosidase foi medida em unidades Miller (SAMBROOK *et al.*, 1989) pelo cálculo que utiliza a fórmula abaixo:

$1000 \times A_{420}/t \times 0,1 \times A_{600}$ , onde:

$A_{420}$  significa a absorbância no comprimento de onda de 420 nanômetros

$A_{600}$  significa a absorbância no comprimento de onda de 600 nanômetros

t significa o tempo em minutos que a cultura levou para desenvolver a coloração amarela

### 2.2.12 Alinhamento de seqüências

As seqüências de proteínas FixABCX, bem como as seqüências de proteínas ETF's (flavoproteínas transportadoras de elétrons) foram retiradas do Banco de Dados da Internet (NCBI – National Center for Biotechnology Information), cujo endereço na internet é <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

O alinhamento das seqüências foi feito através dos pacotes de programas computacionais BioEdit (HALL, 1999) e GeneDoc (NICHOLAS *et al.*, 1997).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Clonagem da região promotora do operon *fixABCX*

SCHRANK *et al.* (1987) construíram um banco genômico de *Azospirillum brasilense* Sp7, do qual foram isolados dois recombinantes específicos,  $\lambda$ Ab2c e  $\lambda$ Ab4. O recombinante  $\lambda$ Ab4 foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI*, dando origem a um fragmento de 15,2 Kb, o qual foi clonado no vetor pACYC184 (ARAÚJO, 1988), gerando o plasmídeo pABC17. Fragmentos de restrição deste recombinante serviram para subclonagens, que foram realizadas no vetor pUC18, resultando na construção de diversos plasmídeos. Entre eles, os plasmídeos pWY3, contendo um fragmento *PstI* de aproximadamente 3,0 Kb e pWY4, contendo um fragmento *PstI-EcoRI* de aproximadamente 0,9 Kb (FRAZZON, 1991). O seqüenciamento destes recombinantes (VEDOY, 1995) mostrou que eles continham os genes *fixABC* de *A. brasilense* Sp7. O recombinante pWY3 abrange a totalidade dos genes *fixA* e *fixB* e a região 5'-terminal de *fixC*. O recombinante pWY4 contém o segmento restante de *fixC*, faltando apenas a região 3'-terminal deste gene.

O recombinante pWY3 foi mapeado com diversas enzimas de restrição e os fragmentos utilizados para novas clonagens. Um fragmento *PstI-HincII* de cerca de 1,8 Kb contendo o gene *nifW*, a região promotora do operon *fixABCX*, o gene *fixA* e a região 5'-terminal de *fixB* foi ligado ao vetor pBluescript SK+, originando o recombinante pJG3 (GROSS, 1999).

Com a finalidade de se isolar a região promotora do operon *fixABCX*, o plasmídeo pJG3 foi utilizado como DNA molde em uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o par de oligonucleotídeos específicos pfix-up e pfix-do (seção 2.1.5), de acordo com as condições descritas na seção 2.2.1. Foi obtido um produto de amplificação de 273 pares de bases (figura 11), que foi purificado, preenchido nas extremidades e clonado no vetor pUC18 clivado com a enzima *SmaI*, dando origem ao recombinante pUCpfix. A seleção dos recombinantes foi realizada conforme descrito na seção 2.2.7, sendo

posteriormente clivados utilizando as enzimas *EcoRI-BamHI* para verificar se o fragmento liberado continha o tamanho esperado de 273 pares de bases. Além disso, alguns recombinantes foram seqüenciados com o objetivo de se determinar a orientação da clonagem (a qual deveria ser no sentido 5'-*EcoRI-BamHI*-3') e a integridade do inserto. O plasmídeo pUCpfix com a orientação de clonagem desejada foi clivado com as enzimas *EcoRI-BamHI* e o fragmento liberado, após purificado, foi clonado no vetor pMC1403, também clivado com as enzimas *EcoRI-BamHI*, originando o recombinante pMCpfix. O plasmídeo pMC1403, além de ter um gene de resistência ao antibiótico Ampicilina, possui o operon da lactose sem a região promotora, permitindo que o gene *lacZ* (o qual codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase) seja transcrito de acordo com a atividade da região reguladora clonada.

O plasmídeo pMCpfix foi transformado em linhagens de *Escherichia coli* MC1061, contendo ou não o plasmídeo pCK3, o qual expressa constitutivamente a proteína NifA de *Klebsiella pneumoniae* (KENNEDY & DRUMMOND, 1985), uma vez que esta não é inativada por oxigênio.

```

GGCCGTTCCGCTTTCCGGCCATCCATCGCCGCCGGGCGTTGTCGGGTTTGTCCGGTAGGCGAC
pfix-up → UAS 1

AGAGGCCGGACCGGGGGCGGAGATCGGGCCGGACCGCCCCAACTCCCCTGTTGAGAAGCCGAC
UAS 2

                                pfixmut-up →
ACGTCCGGTCTTTGTTCGTTTTTGCACACAATCTCTCAACAGCCATTAAATCAATAAAAATACAATAA
UAS 3 ← pfixmut-do

CTTACCGCATCCGCTCAGAACTGGCACGCCGCTTGCTGGTAGGACCATAGCCACGCCGCGCGAC
promotor  $\sigma^{54}$ 

AGGCGGCGGAATGTCAAGGAGACCGGGATG
← pfix-do fixA →

```

Figura 11: Seqüência de nucleotídeos da região promotora do operon *fixABCX*.

Em azul é mostrado a sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas PCR's, em vermelho as UAS's (sítios de ligação da proteína ativadora NifA) e em verde o sítio de reconhecimento para o fator  $\sigma^{54}$  da RNA-polimerase.

### 3.2 Medida da atividade da região promotora do operon *fixABCX*

Após a seleção dos transformantes pMCpfix, foi realizado o ensaio de atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase (seção 2.2.11). Os resultados são apresentados na tabela 4 em Unidades Miller (SAMBROOK *et al.*, 1989).

**TABELA 4: Determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase das linhagens de *E. coli* MC1061 contendo ou não os plasmídeos recombinantes**

Plasmídeo recombinante	Ativador (pCK3)	Atividade de $\beta$ -galactosidase em Unidades Miller
Nenhum	-	11,62
Nenhum	+	20,64
PMCpfix	+	275,29
pMCpfix (branca)	-	28,69
pMCpfix (azul)	-	102,18

As cores branca e azul referem-se à coloração da colônia analisada. Os sinais + e - indicam a presença ou ausência da proteína NifA de *K. pneumoniae*, respectivamente.

Os resultados da tabela demonstram que ocorreu uma variação dos clones recombinantes em relação à dependência da proteína ativadora NifA. Durante a multiplicação das colônias contendo os plasmídeos recombinantes, algumas adquiriram a coloração azul mesmo na ausência de NifA (pCK3). Estes resultados sugeriram que a atividade da região promotora do operon *fixABCX* poderia não ser dependente da presença da proteína ativadora NifA. Este resultado não era esperado, pois a quase totalidade dos genes que participam do processo de fixação biológica do nitrogênio têm a sua atividade



dependente da presença da proteína NifA. Um outro fato relevante é a presença de 3 sítios de ligação (ditos UAS's) para a proteína NifA na região promotora que está sendo analisada.

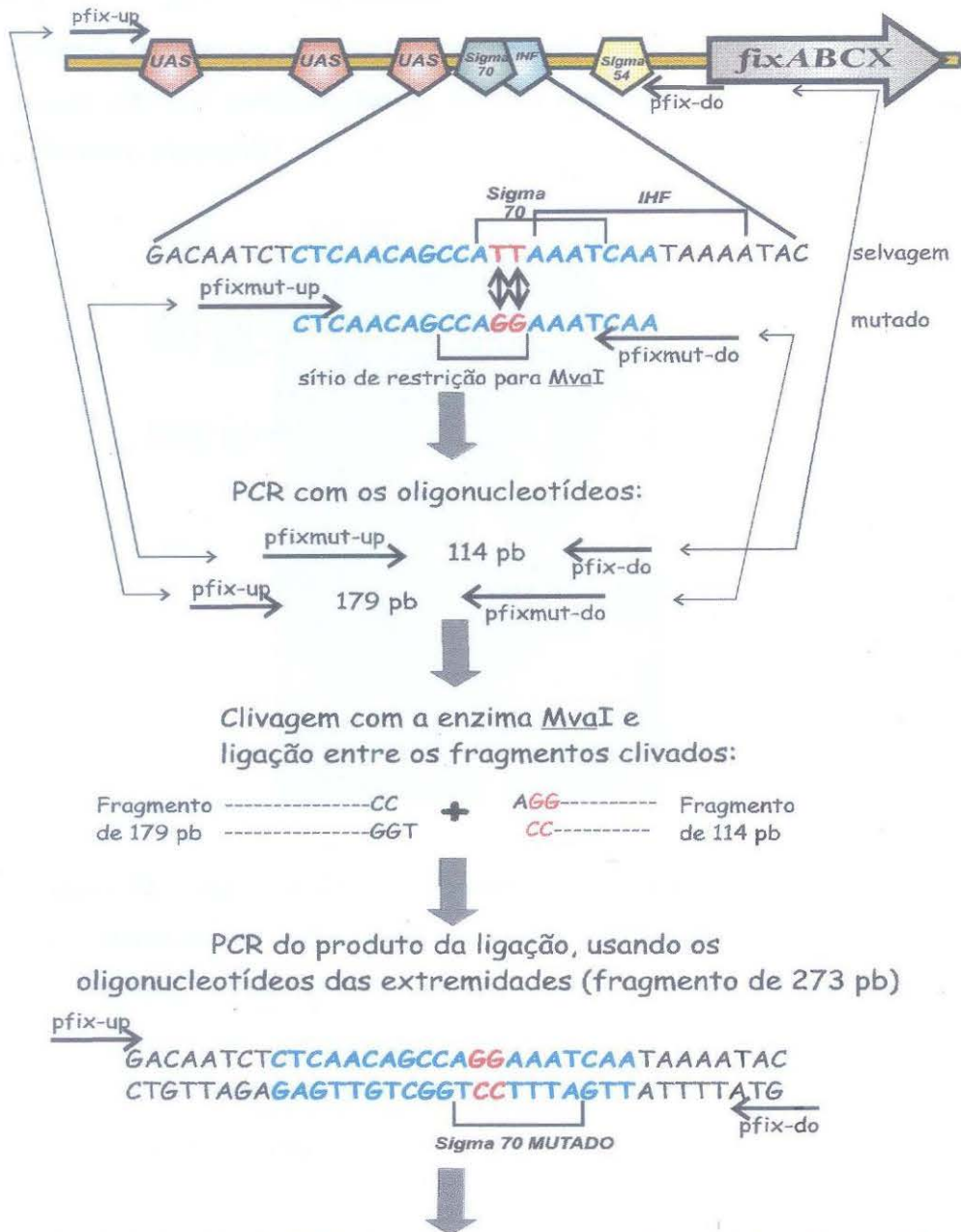
### **3.3 Análise nucleotídica da região promotora do operon *fixABCX***

A seqüência de nucleotídeos da região promotora foi analisada através do site [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html/](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html/) que realiza uma busca por elementos promotores consensuais. A atividade apresentada pela região promotora do operon *fixABCX* na ausência da proteína NifA poderia ser explicada pela presença de uma seqüência de nucleotídeos, semelhante a um TATA box, que poderia estar sendo reconhecida pelo fator  $\sigma^{70}$  da RNA-polimerase de *Escherichia coli*. Esta região promotora típica, semelhante ao TATA, localiza-se adjacente ao sítio de ligação da proteína IHF, sendo uma região rica em timinas e adeninas. Como a análise da região promotora de *A. brasilense* é feita em um sistema heterólogo (regulação de genes de *A. brasilense* sendo estudados em *E. coli*), os resultados obtidos sugerem que o promotor que está sendo reconhecido em *E. coli* não seja funcional em *A. brasilense*. Portanto, a fim de prosseguir o trabalho tornou-se necessário eliminar o reconhecimento da possível seqüência promotora pelo fator  $\sigma^{70}$  da RNA-polimerase de *Escherichia coli*.

### **3.4 Clonagem da região promotora do operon *fixABCX* contendo as alterações nucleotídicas no sítio de reconhecimento para o fator $\sigma^{70}$ de *E. coli***

Através da análise de nucleotídeos da região promotora do operon *fixABCX*, utilizando o programa de análise citado na seção 3.3; foi verificada que a substituição de duas timinas adjacentes por duas guaninas seria suficiente para que a região deixasse de ser reconhecida pelo fator  $\sigma^{70}$  como uma possível região promotora. A estratégia adotada foi a de projetar oligonucleotídeos contendo as alterações desejadas (pfixmut-up e pfixmut-do –

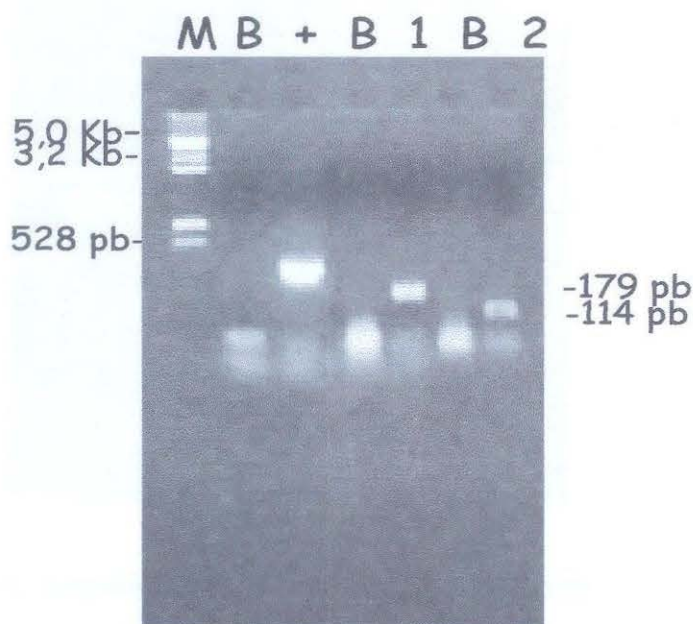
seção 2.1.5) que anelassem na sequência específica. A estratégia utilizada para o desenvolvimento da mutação está mostrada na figura 12.



Clonagem do fragmento de 273 pb, contendo a mutação no sítio de reconhecimento para o fator  $\sigma^{70}$ , no vetor pUC18/SmaI  
 Sequenciamento para selecionar o recombinante desejado

Figura 12: Estratégia para a obtenção das alterações nucleotídicas no sítio de reconhecimento para o fator  $\sigma^{70}$ .

O plasmídeo pJG3 foi utilizado como DNA molde para a realização de uma PCR com os oligonucleotídeos pfix-up e pfixmut-do, resultando na amplificação de um fragmento de 179 pares de bases contendo a mutação na região do oligonucleotídeo. Outra PCR realizada utilizou os oligonucleotídeos pfix-do e pfixmut-up, com um produto de amplificação de 114 pares de bases, também contendo uma mutação na região do oligonucleotídeo (figura 13).

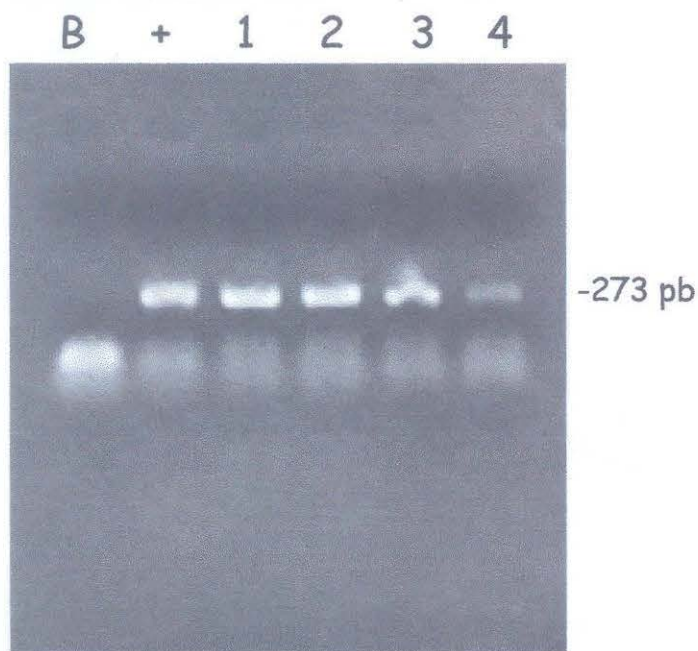


**Figura 13: Amplificação dos fragmentos de 179 e 114 pares de bases.**

M= marcador de peso molecular (pGUSN358 clivado com *EcoRI* e com *EcoRI/HindIII*; pSK+ clivado com *TaqI/Sau3AI*); B= controles negativos das PCRs; += fragmento de 273 pb, produto de amplificação com os oligonucleotídeos pfix-up e pfix-do; 1= fragmento de 179 pb amplificado com os oligonucleotídeos pfix-up e pfixmut-do e 2= fragmento de 114 pb amplificado com os oligonucleotídeos pfixmut-up e pfix-do.

A troca de duas timinas por duas guaninas teve como objetivo adicional a criação de um sítio de restrição para a enzima *MvaI*, que reconhece a seqüência CCAGG. Assim, estes dois fragmentos contendo as alterações nucleotídicas foram clivados com esta enzima, ligados e reamplificados utilizando-se os oligonucleotídeos originais pfix-up e pfix-do,

dando origem a uma região promotora de 273 pares de bases (figura 14) contendo duas alterações que eliminam a região de reconhecimento pelo fator  $\sigma^{70}$  da RNA-polimerase de *E. coli*.

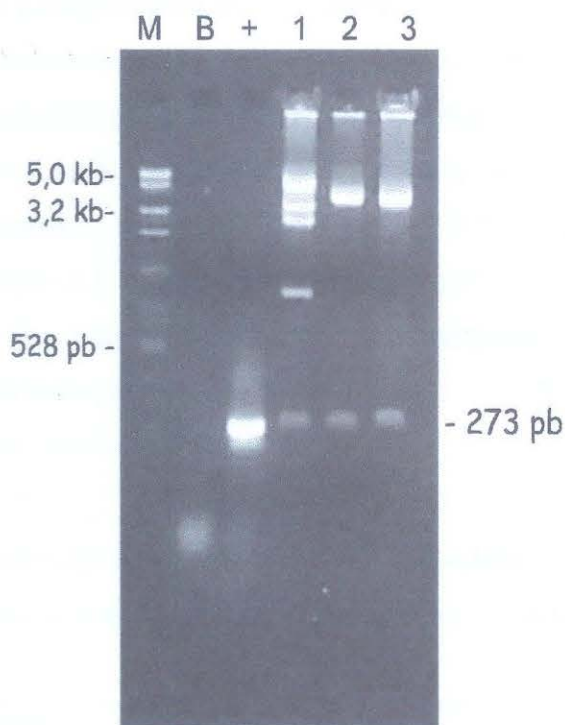


**Figura 14: Amplificação da região promotora contendo as alterações TT→GG.**

B= controle negativo da PCR; += fragmento de 273 pb, produto de amplificação com os oligonucleotídeos pfix-up e pfix-do; 1,2,3 e 4= fragmento de 273 pb, produto de amplificação da ligação entre os fragmentos amplificados e clivados com *MvaI*, utilizando os oligonucleotídeos pfix-up e pfix-do.

O fragmento contendo as alterações nucleotídicas foi purificado, preenchido e clonado no vetor pUC18 clivado com a enzima *SmaI*, resultando no recombinante pUCpfixmut. Vinte clones foram seqüenciados para se determinar a integridade do inserto, a orientação da clonagem e também para constatar a eficiência da estratégia utilizada para criar a mutação. Dos 20 clones seqüenciados, todos continham a mutação (100% de eficiência), sendo que 11 (55%) estavam na orientação desejada (5'-*EcoRI*-*BamHI*-3') e 9 (45%) na orientação inversa.

O recombinante pUCpfixmut contendo o inserto na orientação desejada foi clivado com as enzimas de restrição *EcoRI*-*Bam*HI, liberando o fragmento de 273 pares de bases (figura 15), que, após ser purificado, foi clonado no vetor pMC1403, também clivado com estas enzimas, resultando no recombinante pMCpfixmut.



**Figura 15: Clivagem dos plasmídeos recombinantes com liberação dos fragmentos de 273pb.**

M= marcador de peso molecular (pGUSN358 clivado com *Eco*RI e com *Eco*RI/*Hind*III; pSK+ clivado com *Taq*I/*Sau*3AI); B= controle negativo da PCR; += fragmento de 273 pb, produto de amplificação com os oligonucleotídeos pfix-up e pfix-do e 1, 2 e 3= plasmídeos recombinantes (pUC18) contendo o fragmento de 273 pb com as alterações nucleotídicas, após clivagem com *Eco*RI/*Bam*HI.

Posteriormente, o plasmídeo pMCpfixmut foi transformado em linhagens de *E. coli* MC1061 contendo ou não o plasmídeo pCK3. As colônias selecionadas apresentaram atividade de  $\beta$ -galactosidase (colônia azul) somente na presença de pCK3.

### 3.5 Medida da atividade da região promotora alterada

Como já descrito anteriormente, as linhagens bacterianas foram multiplicadas em meio A até atingirem a absorbância de 0,4 em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nanômetros. A partir destas amostras foi realizado o ensaio de atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 5. Os valores são a média de pelo menos dois experimentos independentes feitos em triplicata. Foram utilizados dois controles negativos: somente a linhagem hospedeira MC1061 e a linhagem hospedeira com o plasmídeo pMCH (Seção 2.1.1). Também foi utilizado como controle positivo a linhagem MC1061 contendo os plasmídeos pMCH e pCK3. As linhagens contendo os plasmídeos recombinante antes da mutação (pMCpfix) com e sem o pCK3 também tiveram suas atividades de  $\beta$ -galactosidase determinadas.

**TABELA 5: Determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase das linhagens de *E. coli* MC1061 contendo ou não os plasmídeos recombinantes**

Plasmídeo recombinante	Ativador (pCK3)	Atividade de $\beta$ -galactosidase em Unidades Miller
Nenhum	-	12,63
Nenhum	+	31,63
pMCpfix	-	119,05
pMCpfix	+	201,61
pMCpfixmut	-	44,64
pMCpfixmut	+	448,09
pMCH	-	30,41
pMCH	+	3472,44

Os sinais + e - indicam a presença ou ausência da proteína NifA de *K. pneumoniae*, respectivamente.

### 3.6 Homologia das proteínas FixABCX de *A. brasilense* com seqüências de outras proteínas disponíveis no banco de dados

As seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas FixABCX de *A. brasilense* Sp7 depositadas no Banco de Dados da Internet (NCBI – National Center for Biotechnology Information – dado não-publicado – número de acesso AF489443) foram utilizadas com o objetivo de identificar seqüências relacionadas em outros organismos com alto grau de similaridade. As proteínas FixABCX de *A. brasilense* Sp7 mostraram alto grau de similaridade com proteínas FixABCX de diversas bactérias diazotróficas, como *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium etli*, *Azotobacter vinelandii*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium meliloti* (figuras 16, 17, 18 e 19). Além destas, foram encontradas outras seqüências que apresentavam elevada similaridade, como os membros de uma grande família de flavoproteínas com função no transporte de elétrons em diversos organismos, inclusive humanos. As proteínas FixAB possuem identidade com ETF $\alpha\beta$  (flavoproteína transportadora de elétrons, do inglês *electron transfer flavoprotein*). Esta proteína é composta por duas sub-unidades, onde a sub-unidade alfa é similar a FixB e a sub-unidade beta é similar a FixA (figuras 20 e 21). Já as proteínas FixCX apresentam regiões de similaridade com a proteína ETFQO-ubiquinona oxireductase (figuras 22 e 23).

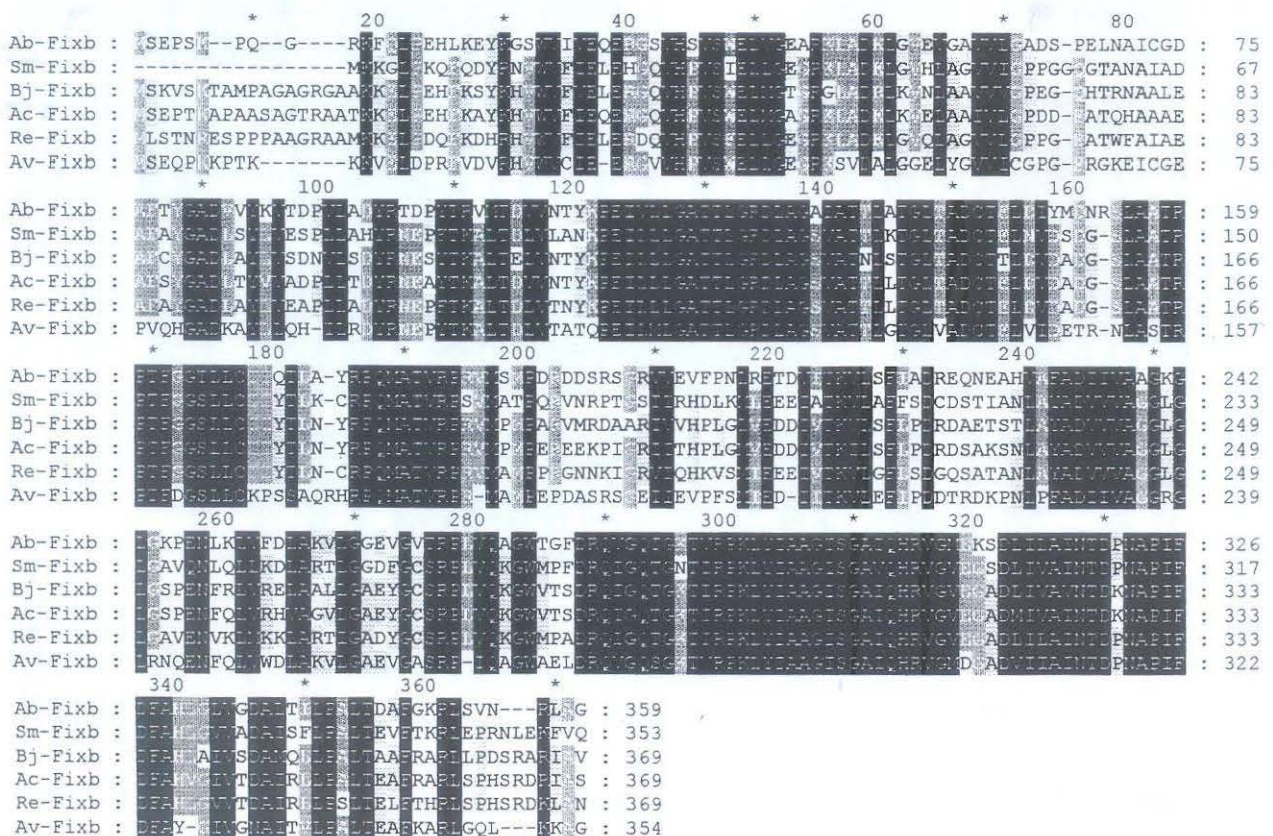
	*	20	*	40	*	60	*	80																																									
Ab-Fixa :	GRIN	VGIR	QVSDSA	IP	PH	HTN	INR	QV	PA	IN	ED	IS	EE	AR	RS	KV	GR	WT	VT	IK	GE	MA	ET	SP	PA	LD	GA	DE	VE	LI	: 84																		
Sm-Fixa :	GH	IN	VGIR	QVSDSA	IP	PH	HTN	INR	QV	PT	IN	PH	DLA	EE	AL	KC	CT	YS	EE	TV	IM	SE	KM	AE	DA	LP	KL	GC	HR	AV	LI	: 84																	
Bj-Fixa :	GN	IN	VGIR	QVSDSA	IP	PH	HTN	INR	QV	PT	IN	PH	DLA	EE	AL	GR	UR	FS	EE	TV	IM	SE	KE	MA	DA	LP	KL	GC	HR	AV	LI	: 84																	
Ac-Fixa :	GH	IN	VGIR	QVSDSA	IP	PH	HTN	INR	QV	PT	IN	PH	DLA	EE	AL	AL	Q	HS	EE	TV	IM	SE	KE	MA	DA	LP	KL	GC	HR	AV	LI	: 84																	
Re-Fixa :	GR	IN	VGIR	QVSDSA	IP	PH	HTN	INR	QV	PT	IN	PH	DLA	EE	AL	AL	Q	HS	EE	TV	IM	SE	KE	MA	DA	LP	KL	GC	HR	AV	LI	: 84																	
Av-Fixa :	GS	SM	VGIR	QVSDSA	IP	PH	HTN	INR	QV	PA	IN	ED	IS	EE	AR	RS	KV	GR	WT	VT	IK	GE	MA	ET	SP	PA	LD	GA	DE	VE	LI	: 84																	
	*	100	*	120	*	140	*	160																																									
Ab-Fixa :	TE	PK	FA	GS	DT	LATS	VAL	TS	IK	LS	EE	QV	DL	VE	CK	IN	VD	GD	TA	VG	GG	IA	TR	GF	Q	LT	YT	TK	ES	LI	QGA	EIV	H	EE	PP	SE	: 167												
Sm-Fixa :	TE	PK	FA	GS	DT	LATS	FAL	AO	IAE	EG	TE	GT	PP	NV	EG	NT	IG	DT	TA	VG	GG	IA	TR	DL	Q	LT	Y	AK	LS	LI	AA	S	EIT	H	EE	PP	AE	: 168											
Bj-Fixa :	TE	PK	FA	GS	DT	LATT	VAL	AT	IR	EG	KE	Y	GP	AN	LE	GN	TD	IG	DT	TA	VG	GG	IA	TR	GV	G	LT	Y	AK	RS	LI	VA	NET	IEA	PP	SE	: 168												
Ac-Fixa :	TE	PK	FA	GS	DT	LATT	VAL	AT	IR	EG	TE	GA	PP	IV	EG	NT	IG	DT	TA	VG	GG	IA	TR	GLL	LT	Y	AK	RS	LI	VA	N	EL	LAG	S	IQ	EE	PP	SE	: 168										
Re-Fixa :	TE	PK	FA	GS	DT	LATS	FAL	SR	IA	EG	AF	GT	PP	NV	EG	NT	IG	DT	TA	VG	GG	IA	TR	DL	L	LT	Y	AK	RS	LI	VA	N	EL	ING	EIT	H	EE	PP	AE	: 168									
Av-Fixa :	TE	PK	FA	GS	DT	LATS	VAL	SA	VR	EM	DM	PV	LL	IE	EG	NT	IG	DT	TA	VG	GG	IA	TR	DY	Q	L	YT	TK	ES	LI	QGA	EIV	H	EE	PP	AE	: 167												
	*	180	*	200	*	220	*	240																																									
Ab-Fixa :	GG	V	IK	AL	EP	MI	TH	LG	NT	IF	EG	KD	EM	FR	AP	Y	GE	KT	NK	DT	TE	AE	TK	V	LG	S	ET	TV	SK	VE	KE	PA	K	IT	M	EE	AE	A	: 250										
Sm-Fixa :	GG	S	IR	GL	PC	IN	TH	LD	GA	AI	FR	GR	DD	AL	PA	AP	TK	VK	TS	AA	D	CA	E	P	A	N	C	L	R	G	S	P	T	V	K	VE	E	T	S	E	K	A	R	C	D	T	T	N	: 252
Bj-Fixa :	GG	V	IK	AL	EP	MI	TH	LG	NT	IF	EG	KD	EM	FR	AP	Y	GE	KT	NK	DT	TE	AE	TK	V	LG	S	ET	TV	SK	VE	KE	PA	K	IT	M	EE	AE	A	: 252										
Ac-Fixa :	GG	V	IK	AL	EP	MI	TH	LG	NT	IF	EG	KD	EM	FR	AP	Y	GE	KT	NK	DT	TE	AE	TK	V	LG	S	ET	TV	SK	VE	KE	PA	K	IT	M	EE	AE	A	: 252										
Re-Fixa :	GG	T	IK	AL	EP	MI	TH	LG	NT	IF	EG	KD	EM	FR	AP	Y	GE	KT	NK	DT	TE	AE	TK	V	LG	S	ET	TV	SK	VE	KE	PA	K	IT	M	EE	AE	A	: 252										
Av-Fixa :	GG	V	IK	AL	EP	MI	TH	LG	NT	IF	EG	KD	EM	FR	AP	Y	GE	KT	NK	DT	TE	AE	TK	V	LG	S	ET	TV	SK	VE	KE	PA	K	IT	M	EE	AE	A	: 251										
	260	*	280	*																																													
Ab-Fixa :	PT	AE	A	Q	A	A	A	A	E	A	T	E	G	A	C	E	K	A	D	E	L	L	A	R	A	A	A	G	L	-----	: 283																		
Sm-Fixa :	K	P	L	R	E	I	D	G	L	A	A	A	E	A	D	R	E	A	K	H	D	E	G	S	T	G	Q	Q	G	A	P	D	V	D	R	E	S	-----	: 292										
Bj-Fixa :	Q	-	P	-----	: 288																																												
Ac-Fixa :	T	A	P	-----	: 281																																												
Re-Fixa :	K	T	P	R	D	I	E	E	L	E	A	G	I	E	L	R	C	A	E	S	E	A	F	D	G	E	-----	: 282																					
Av-Fixa :	S	D	P	K	N	L	E	E	A	A	A	K	L	E	T	O	H	E	N	E	Q	E	A	K	R	A	V	-----	: 281																				

**Figura 16: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína FixA de *A. brasilense* e de outras bactérias diazotróficas.**

Ab= *Azospirillum brasilense* (número de acesso no GenBank AAM00917); Sm= *Sinorhizobium meliloti* (P09818); Bj= *Bradyrhizobium japonicum* (P53577); Ac= *Azorhizobium caulinodans* (P26482); Re= *Rhizobium etli* (AAM54827); Av= *Azotobacter vinelandii* (P53576).

A proteína FixA de *A. brasilense* apresentou 69% de similaridade com a proteína FixA de *S. meliloti*, 70% com *B. japonicum*, 74% com *A. caulinodans*, 71% com *R. etli* e 80% com *A. vinelandii*.

A cor preta indica resíduos conservados em todas as seqüências alinhadas (100%), cinza escuro indica resíduos conservados em pelo menos 80% das seqüências e cinza claro indica resíduos conservados em pelo menos 60% das seqüências.



**Figura 17: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína FixB de *A. brasilense* e de outras bactérias diazotróficas.**



Ab= *Azospirillum brasilense* (número de acesso no GenBank AAM00919); Sm= *Sinorhizobium meliloti* (P09819); Bj= *Bradyrhizobium japonicum* (P10449); Ac= *Azorhizobium caulinodans* (P26483); Re= *Rhizobium etli* (AAM54826); Av= *Azotobacter vinelandii* (P53574).

A proteína FixB de *A. brasilense* apresentou 72% de similaridade com a proteína FixB de *S. meliloti*, 73% com *B. japonicum*, 77% com *A. caulinodans*, 75% com *R. etli* e 73% com *A. vinelandii*.

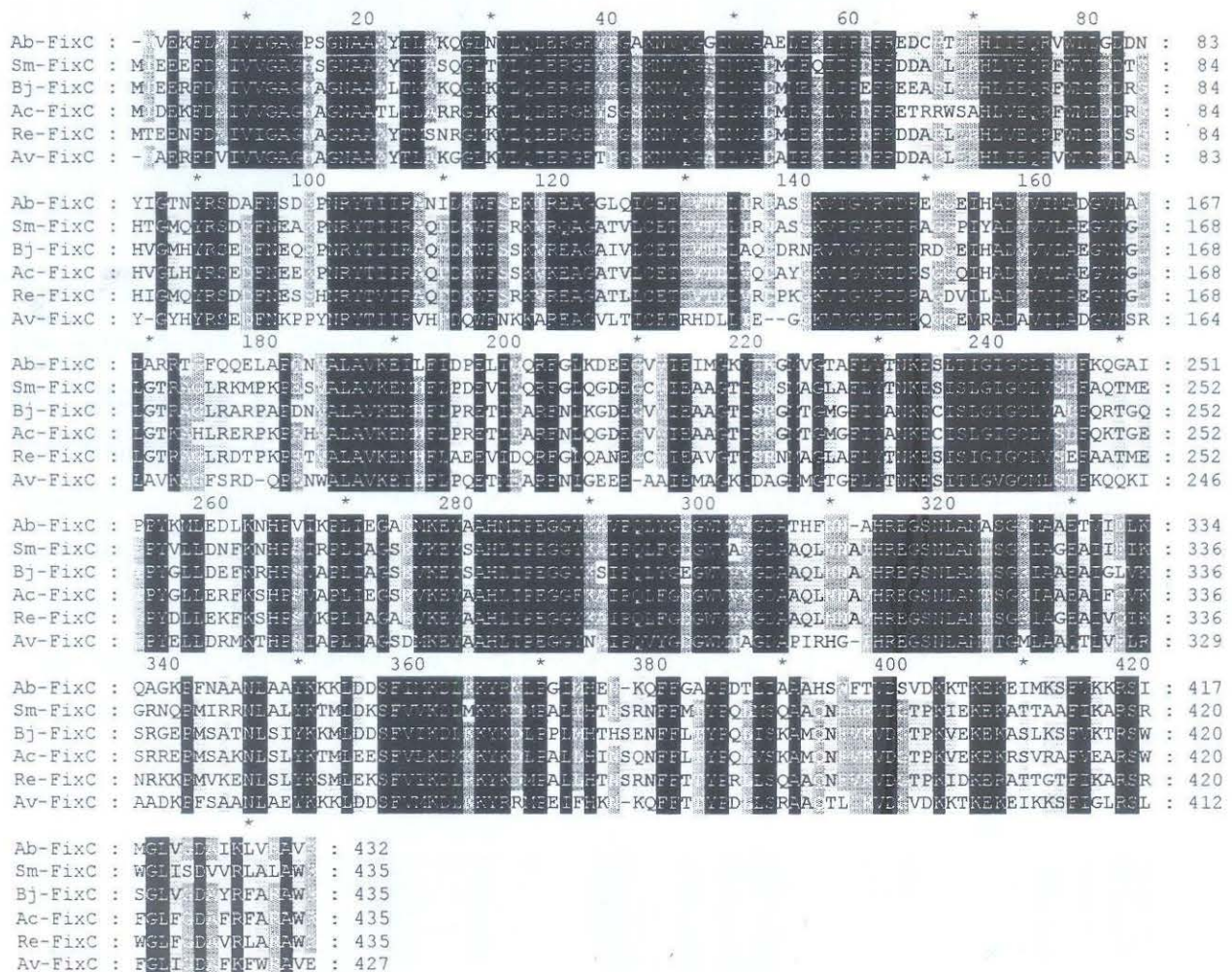
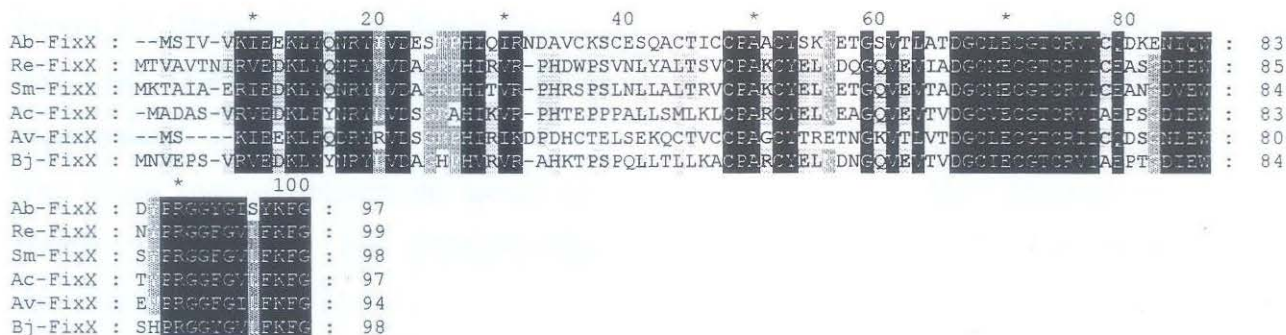


Figura 18: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína FixC de *A. brasilense* e de outras bactérias diazotróficas.

Ab= *Azospirillum brasilense* (número de acesso no GenBank AAM00918); Sm= *Sinorhizobium meliloti* (P09820); Bj= *Bradyrhizobium japonicum* (P10331); Ac=

*Azorhizobium caulinodans* (P26484); Re= *Rhizobium etli* (AAM54825); Av= *Azotobacter vinelandii* (P53572).

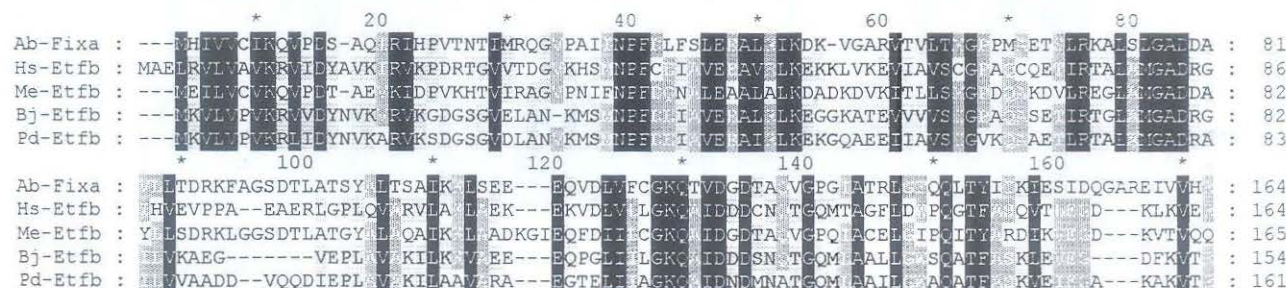
A proteína FixC de *A. brasilense* apresentou 77% de similaridade com a proteína FixC de *S. meliloti*, 77% com *B. japonicum*, 76% com *A. caulinodans*, 75% com *R. etli* e 78% com *A. vinelandii*.



**Figura 19: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína FixX de *A. brasilense* e de outras bactérias diazotróficas.**

Ab= *Azospirillum brasilense* (número de acesso no GenBank AAM00920); Sm= *Sinorhizobium meliloti* (P09821); Bj= *Bradyrhizobium japonicum* (P10326); Ac= *Azorhizobium caulinodans* (P26485); Re= *Rhizobium etli* (AAM54824); Av= *Azotobacter vinelandii* (CAA46491).

A proteína FixX de *A. brasilense* apresentou 69% de similaridade com a proteína FixX de *S. meliloti*, 66% com *B. japonicum*, 61% com *A. caulinodans*, 75% com *R. etli* e 62% com *A. vinelandii*.



```

      180          *          200          *          220          *          240          *          2
Ab-Fixa : RSESEFVKTALFCHTLMLEGTMTIRFGKIDDFRFRARYGLKKTWNKDTTAEETKVGLKGSPTVWSK FVEKPAQKATNVEAEA : 250
Hs-Etfb : IDGCTRLKLEAFADLRNTPAALPDKKPKKIEVIKPGDLVLTSK-----LSWIS EDEPQTA VKKETTED : 244
Me-Etfb : NEESYIVTEAQFVLLIAVKDMLREPFRGTKPRREEPNLDAAAVAA DAQIGLSGSPTKVRK FTE-PQRS GLNKKVED : 250
Bj-Etfb : VDSCTKLKGEALITDLRMRPAALPDKKPKKIEAEKTVADYVTA-R-----LEMLKTTTEAGKA VKKQDVAE : 233
Pd-Etfb : VDSCTAVSLEAVITADLRMRPAALPDKKPKKIEAEKTVADYVTA-R-----LEMLKTTTEAGKA VKKQDVAE : 241
      60          *          280          *
Ab-Fixa : PTAEAQAAAAEAFGAQPKLADELLARAAAGL : 283
Hs-Etfb : LVAKLK-EIGRI----- : 255
Me-Etfb : DNEQAIVDQVEKLV-----AQKII----- : 270
Bj-Etfb : LVSKLKNEAGL----- : 245
Pd-Etfb : LVGKLGK-EAGL----- : 252

```

**Figura 20: Homologia da sequência de aminoácidos da proteína FixA de *A. brasilense* com a sub-unidade  $\beta$  de ETF's (flavoproteínas transportadoras de elétrons) de outros organismos.**

Hs= *Homo sapiens* (número de acesso no GenBank AAN03713); Me= *Megasphaera elsdenii* (AAC31169); Bj= *Bradyrhizobium japonicum* (P53575); Pd= *Paracoccus denitrificans* (AAA03071).

A proteína FixA de *A. brasilense* apresentou 42% de similaridade com a sub-unidade  $\beta$  da proteína ETF $\alpha\beta$  de *H. sapiens*, 60% com *M. elsdenii*, 42% com *B. japonicum* e 41% com *P. denitrificans*.

```

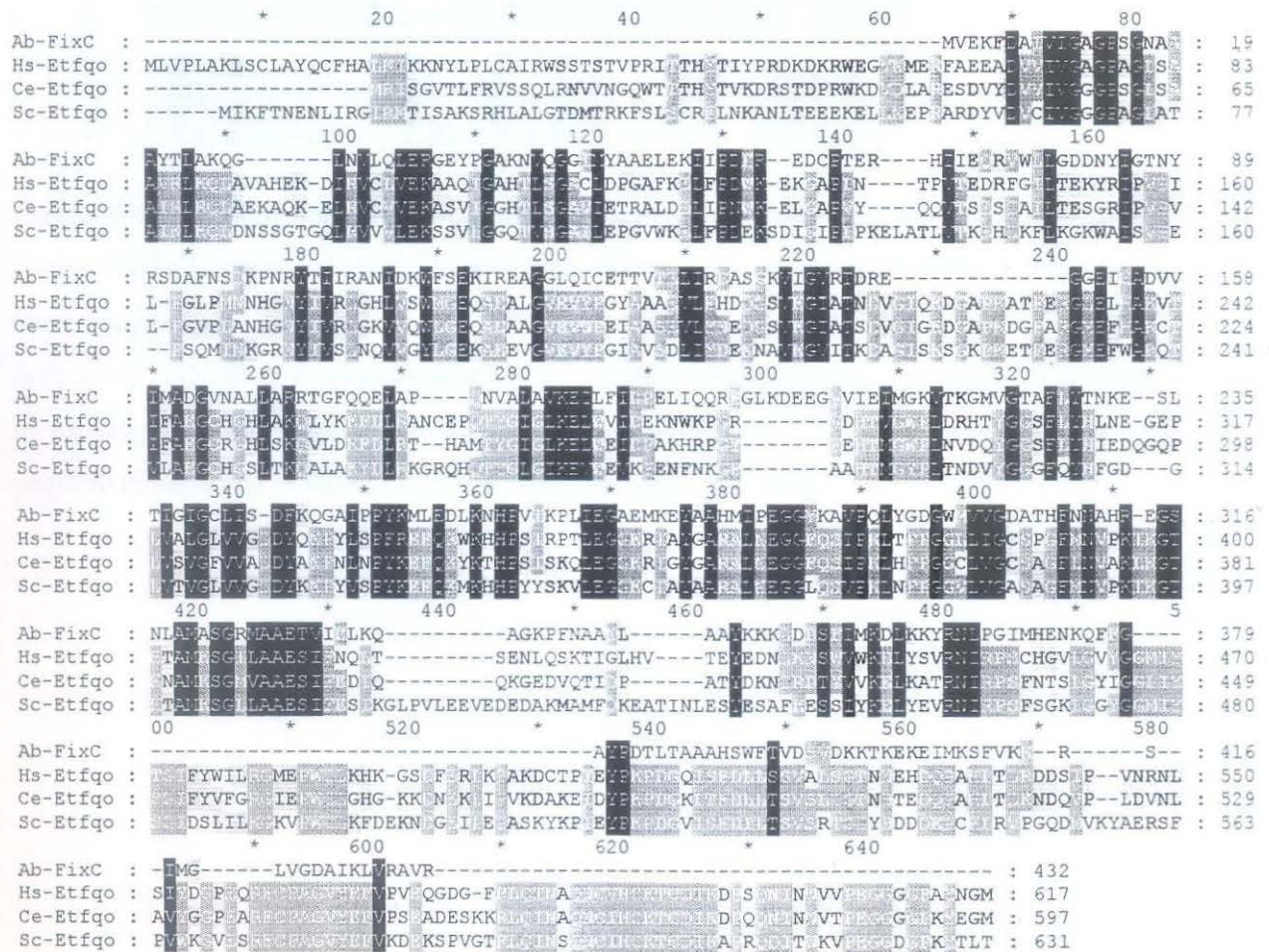
      *          20          *          40          *          60          *          80
Ab-Fixa : MSEPSPKQGRKFQLPEHLKEYKGSWVEVQERGSVHSHVSWELVGEIRKLDKLEVENGAVLADSPELNAICGDAFT-YEADV : 83
Hs-Etfa : --MFRAAAPGQLRRAASLLRFQSTLVAASHANDSL----APITLNTITATRLGGEVSCDACTK---CDKVQDLCKVAGIA : 75
Me-Etfa : -----MDLAEYKGLYVAEQFEGKLRDVSFELLGQIRILDITIGDEVGATIGKD---VKPLQELIA-HEAH : 65
Bj-Etfa : -----MTLLLAHHDNASL-----KDATNKLTAALGADVEVLAGEG---AKAA DAAAKLAGVK : 56
Pd-Etfa : -----MAVLLGCVTNGALN---RDATAKVAAVKALG-DYTVLCAGAS---AKAAEAAK-AEVA : 55
      *          100          *          120          *          140          *          160
Ab-Fixa : YKVTDP LADYRTDPYTRMTDVVNTYKPEI LLGDTLGGDIAGATTTIATGLTACTEIDIYMDNRSLAATETGTTL : 167
Hs-Etfa : VLAQHDYKGLLPEELTPILLATQKQFNHYHCAGASAFGRILLRVAKEVAPISITIAIKSP-----T VPTIAGTAL : 154
Me-Etfa : VY YDDPQLEHYNTTAYAKVICDFHEEKPNVFLVGAATNIGRDLGELVNSIKTGLTACTQLGVD DKKTIVTPEALGGIIM : 149
Bj-Etfa : VLAADGAYAHDLAEPLAALIVSLAP--SYDAVAPATSRFRNMMRVEALLDVMQVSEIIKVWAP-----T EREIAGTAT : 133
Pd-Etfa : VLAEDA YGHRLAEPATAIVGLAG--DYSHAAPATTDKRNMMRVEALLDVM-VSIVSAILDA-----T EREIAGTAT : 131
      *          180          *          200          *          220          *          240          *
Ab-Fixa : CTIQTLAYRPOHATVPRVMSMPDRDDSRSGRVVFPNLRETDI LKLSFIADREQNEAHVAFEDLVAACFELGKPNLK- : 250
Hs-Etfa : CTIKC-DEKVKVFSVGTSDAAATS--GGSASS KASSTSPVESEW DQKTKSDRP--ELTGAKVMSGRGLKGENK- : 232
Me-Etfa : AEEICPDNRPOHGTVPHVKKPEADPSATGEVKKANLSDADFMKFVELIKLGGEG-VKTEDDITVAQFGINDEEPKKT : 232
Bj-Etfa : QTKS-KDAKKVITVETSTAAAGE---GGSAPSVQAAADPGSFFGEEVAKSDRP--ELTSKQVMSGRAPRENKAK : 211
Pd-Etfa : QVVKSKDAKKVITVETSTAAAGE---GGSAPSVQAAADPGSFFGEEVAKSDRP--ELTSKQVMSGRAPRENKAK : 207
      *          260          *          280          *          300          *          320          *
Ab-Fixa : -LFDLKVLEGEVETPPLDQVETGFRVYVGTGTTREKLYTAAISGAIKRVGMEKSDLLRLINTEPNPPIEDFHLGL : 333
Hs-Etfa : -LHYDEQLHAAVGRSPVNDGEVFNMMVGTGTHAEELVAVISGAIKRVGMEKSDKTIIVAINDEEPIEQVYGI : 315
Me-Etfa : GAIKECAVLEGAVGSRPNDGWIDALHVTGTTGTVGKRIYIACAISGAIPIVGTGSDCIITAINDEEPIEQVYGI : 316
Bj-Etfa : -YIEPDKLKVAGVGRSPVNDGVAENWVGTGTVGKRIYIACAISGAIPIVGTGSDCIITAINDEEPIEQVYGI : 294
Pd-Etfa : -LIEEIKLKVAGVGRSPVNDGVAENWVGTGTVGKRIYIACAISGAIPIVGTGSDCIITAINDEEPIEQVYGI : 288
      340          *          360
Ab-Fixa : VGEALTLPALTDAFGRLSVNRLAG : 359
Hs-Etfa : VAEKKEEETEIKKK----- : 333
Me-Etfa : VGEKLELLTEAKQKQKIA---- : 338
Bj-Etfa : VAEKQAVEELTAEGLGK----- : 314
Pd-Etfa : VGEKLSVEELGK----- : 303

```

**Figura 21: Homologia da sequência de aminoácidos da proteína FixB de *A. brasilense* com a sub-unidade  $\alpha$  de ETF's (flavoproteínas transportadoras de elétrons) de outros organismos.**

Hs= *Homo sapiens* (número de acesso no GenBank AAN03712); Me= *Megasphaera elsdenii* (AAC31170); Bj= *Bradyrhizobium japonicum* (P53573); Pd= *Paracoccus denitrificans* (AAA03072).

A proteína FixB de *A. brasilense* apresentou 42% de similaridade com a sub-unidade  $\alpha$  da proteína ETF $\alpha\beta$  de *H. sapiens*, 57% com *M. elsdenii*, 40% com *B. japonicum* e 40% com *P. denitrificans*.



**Figura 22: Homologia da seqüência de aminoácidos da proteína FixC de *A. brasilense* com a região N-terminal de ETFQO's (flavoproteínas ubiquinonas-oxidoredutases) de outros organismos.**

Hs= *Homo sapiens* (número de acesso no GenBank Q16134); Ce= *Caenorhabditis elegans* (Q11190); Sc= *Saccharomyces cerevisiae* (Q08822).

A proteína FixC de *A. brasilense* apresentou 31% de similaridade com a proteína ETFQO de *H. sapiens*, 33% com *C. elegans* e 29% com *S. cerevisiae*.

```

500          *          520          *          540          *          560          *          580
Ab-FixX : -----SIVVKIEEKLQN-----RLLID-----ESRE--FQQNFAAC-----SCESQACT : 42
Hs-Etfqo : MEKHK-GSFRRLKAKDCTPEEHSIQEFLINLALNNEHSAEITRLSEP--VN_NLS--DPLQ : 558
Ce-Etfqo : IEGHGHG-KKKNKLIIVKDAKEDEKCHCKKFFLENSLGLNTEAEITKLFQEP--LDVNLA--GPA : 537
Sc-Etfqo : KVVKFDKKNGLIEASKYKPEKNGNIVLFLIEISRSYDDLECEIRPGQDVKYAE--SFP--KVIS : 571

          *          600          *          620          *          640
Ab-FixX : ICCEACLS---KNETG--STTATDGGEEGFRVCQDKENQDYERQYFISKFG : 97
Hs-Etfqo : CPPEYKLVLPVQGDG-FLLTFAQVNSQDQIL--D--SNNNVVVE--GG--AANGM : 617
Ce-Etfqo : CEPYKLVLPVQGDG-FLLTFAQVNSQDQIL--D--QNNNVVTE--GG--KKEGM : 597
Sc-Etfqo : CPPEYKLVLPVQGDG-FLLTFAQVNSQDQIL--A--RDETRKVE--GDE--KTLT : 631

```

**Figura 23: Homologia da seqüência de aminoácidos da proteína FixX de *A. brasilense* com a região C-terminal de ETFQO's (flavoproteínas ubiquinonas-oxidoredutases) de outros organismos.**

A proteína FixX de *A. brasilense* apresentou 6% de similaridade com a proteína ETFQO de *H. sapiens*, 7% com *C. elegans* e 6% com *S. cerevisiae*. Estes valores são baixos devido ao pequeno tamanho da proteína FixX, em relação à proteína ETFQO.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade da região promotora do operon *fixABCX* é dependente da presença da proteína NifA

A fixação biológica do nitrogênio é um processo muito específico, que requer condições especiais no ambiente da célula para que ocorra a redução do nitrogênio atmosférico em amônia. Esta reação química não é de fácil ocorrência devido à alta estabilidade do nitrogênio molecular que, com sua tripla ligação covalente, é muito resistente a qualquer agressão química. Justamente por este motivo, Lavoisier denominou este composto de “azoto”, que significa sem vida, por ser o nitrogênio muito pouco reativo (STRYER, 1992).

Sendo assim, a natureza criou, com a fixação do nitrogênio, um sistema bioquímico muito sofisticado, capaz de superar as dificuldades naturais e conseguir a quebra da barreira de ativação para a reação de redução do N<sub>2</sub>. Este sistema tem a característica de possuir uma flexibilidade adequada para atuar de maneira ótima, quando as condições ambientais são favoráveis, ou ser paralisado, em função de circunstâncias desfavoráveis. Três aspectos básicos vão determinar o funcionamento do complexo sistema da fixação do nitrogênio: as concentrações de amônia intercelulares, indicando a abundância de nitrogênio para o metabolismo; a quantidade de ATP presente no meio, possibilitando uma disponibilidade de energia para o funcionamento de todo maquinário do sistema de fixação do nitrogênio; e a concentração de oxigênio no ambiente, composto que, por ter uma alta capacidade oxidante, impede que ocorra um fluxo de elétrons para o fraco agente oxidante, que é o nitrogênio molecular (GUSSIN *et al.*, 1986).

O foco central de todo o processo de controle da fixação do nitrogênio, em função das condições ambientais, recai sobre a ativação da transcrição dos genes que codificam os componentes protéicos que participarão, direta ou indiretamente, da redução do nitrogênio molecular. Isto é realizado pela RNA-polimerase associada a um fator sigma alternativo, denominado fator sigma 54 ou sigma N, que se liga a seqüência de consenso -24 (GG)/-12 (GC), presente em regiões promotoras de muitos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio (SHINGLER, 1996).

Interessante é que a RNA-polimerase complexada com o fator sigma 54, por si só, não é capaz de promover a transcrição dos genes de fixação do nitrogênio. Ela necessita de um outro componente capaz de constituir um complexo de transcrição realmente funcional, representado pela proteína NifA. Essa proteína desempenha um papel fundamental, pois, sobre ela, incide toda uma cascata de sinalização, capaz de detectar as condições ambientais existentes na célula, fazendo da proteína NifA um mediador para o ajuste fino de adaptação a condições propícias para a fixação do nitrogênio. Com ambiente favorável, como baixa tensão de O<sub>2</sub> e baixos níveis de amônia na célula, o gene *nifA* encontra-se ativo e o seu produto, livre para atuar, promove a ativação dos genes de fixação do nitrogênio. O contrário ocorre quando as condições ambientais não são favoráveis (alta concentração de oxigênio e reservas de amônia), levando à repressão do gene *nifA* e do seu produto (GUSSIN *et al.*, 1986).

A regulação da transcrição dos genes de fixação do nitrogênio pela proteína NifA, combinada com o fator sigma 54, foi caracterizada em inúmeras bactérias diazotróficas como *K. pneumoniae* (OW & AUSUBEL, 1983), *S. meliloti* (SZETO *et al.*, 1984), *B. japonicum* (ALVAREZ-MORALES *et al.*, 1986), *R. leguminosarum* (ROELVINK *et al.*, 1990) e *A. brasilense* Sp7 (LIANG *et al.*, 1991). Estudos também desvendaram o mecanismo de atuação da proteína NifA na ativação dos genes *nif*. Foi demonstrado, principalmente para *K. pneumoniae*, que esta proteína liga-se a seqüências chamadas UAS, caracterizadas pelo consenso TGT-N<sub>10</sub>-ACA, situadas cerca de 100 ou mais pares de bases à montante do início da transcrição (GUSSIN *et al.*, 1986). Esta região de DNA seria responsável pela ancoragem da proteína NifA que, por intermédio do fator de integração ao hospedeiro (IHF), provocaria uma curvatura no DNA aproximando, desta forma, a proteína NifA da RNA-polimerase, formando um complexo de iniciação da transcrição perfeitamente funcional (BUCK & CANNON, 1989).

A determinação da funcionalidade dos promotores dos genes *nif* estruturais tem sido realizada através da fusão com o gene *lacZ* em *K. pneumoniae* (KENNEDY & DRUMMOND, 1985), *B. japonicum* (ALVAREZ-MORALES & HENNECKE, 1985), *R. leguminosarum* (ROELVINK *et al.*, 1990) e *A. brasilense* (LIANG *et al.*, 1991; PASSAGLIA *et al.*, 1995). A mesma metodologia foi utilizada para os promotores dos genes *nifE* e *nifU* (CANNON *et al.*, 1990; CANNON *et al.*, 1991) e *nifJ* (CHARLTON *et al.*, 1993) de *K. pneumoniae*; o promotor do gene *fixJ* (WEINSTEIN *et al.*, 1993) de *S. meliloti*; o promotor do operon *fixRnifA* (THÖNY

*et al.*, 1984) de *B. japonicum* e os promotores dos genes *nifA* e *nifB* (LIANG *et al.*, 1992) e *nifE* (POTRICH *et al.*, 2001) de *A. brasilense*.

Em *K. pneumoniae*, o operon formado pelos genes *nifUSVWZM* (ARNOLD *et al.*, 1988) apresentou a região promotora consenso -24 (GG)/-12 (GC) e três sítios de ligação para a proteína NifA. CANNON *et al.* (1990) caracterizaram e demonstraram a funcionalidade desta região e a sua interação com a proteína NifA. Em *A. vinelandii*, o operon *nifUSVORF7* é precedido de uma seqüência aberta de leitura (*ORF6*). Nessa bactéria, a região promotora e a UAS estão localizadas à montante da *ORF6*, formando uma unidade transcricional. Por sua vez, o operon *nifUSVORF7* não apresenta uma UAS própria, sendo sugerido que este operon poderia usar a UAS que precede a *ORF6* e esta serviria, potencialmente, para ativar o promotor do gene *nifU* (JACOBSON *et al.*, 1989b).

FRAZZON (1996) demonstrou que a região promotora do operon *ORF2nifUSVORF4* de *A. brasilense* apresenta uma típica seqüência promotora consenso (GG/GC) e uma seqüência UAS distante aproximadamente 100 pares de bases do início da transcrição de *ORF2*. Para comprovar a funcionalidade desta região foram realizadas construções com o plasmídeo pMC1403, clonando a região promotora (contendo a UAS) deste operon, fusionada com o gene *lacZ*. Experimentos de determinação da atividade de expressão de  $\beta$ -galactosidase, realizados em linhagens de *E. coli* MC1061, foram realizados na presença e ausência do plasmídeo pCK3, que expressa a proteína NifA de *K. pneumoniae* constitutivamente (KENNEDY & DRUMMOND, 1985). Os resultados demonstraram que a funcionalidade deste promotor era independente da presença de NifA, indicando que o promotor responsável pela transcrição do operon *ORF2nifUSVORF4* apresentava uma expressão constitutiva em *E. coli*. Análises na seqüência de nucleotídeos da região promotora identificaram uma outra região promotora, essa dependente do fator sigma 70 da RNA-polimerase (FRAZZON, 1996).

Embora a seqüência UAS também seja importante para a ativação dos genes estruturais da nitrogenase nas bactérias *S. meliloti* e *B. japonicum*, o mesmo efeito não é verificado para a expressão dos genes *fixABCX* nestas mesmas bactérias (BETTER *et al.*, 1985; GUBLER & HENNECKE, 1988; GUBLER, 1989; CEBOLLA *et al.*, 1994). Estudos a partir de deleções na região reguladora demonstraram claramente que as seqüências UAS não são importantes, mesmo sendo a proteína NifA a reguladora positiva da transcrição dos genes *fixABCX*. Na verdade, em *B. japonicum* não foram determinadas seqüências UAS típicas, apresentando somente uma UAS



imperfeita (TGT-N<sub>10</sub>-ACC) na região reguladora de *fixBCX*, sendo que, à montante de *fixA*, não foi encontrada nenhuma seqüência para ligação da proteína NifA.

Na região promotora do operon *fixABCX* de *A. brasilense* foi identificada uma região promotora consenso (5' GG-N<sub>10</sub>-GC 3'), representando um sítio de ligação da RNA-polimerase dependente do fator alternativo sigma 54, juntamente com 3 seqüências ativadoras UAS (5' TGT-N<sub>10</sub>-ACA 3') localizadas de 100 a 190 pares de bases do início da transcrição e uma seqüência rica em adeninas e timinas, que corresponde ao sítio de ligação da proteína IHF (GROSS, 1999 e figura 11). Na região promotora ainda foi identificada (similar ao encontrado na região reguladora do gene *nifU*) uma seqüência de nucleotídeos que apresenta um potencial sítio de reconhecimento pelo fator sigma 70 da RNA-polimerase de *E. coli*, sobrepondo-se em alguns nucleotídeos com o sítio de IHF (SPEROTTO *et al.*, 2002).

Os resultados da análise da seqüência acima sugeriram que, em *A. brasilense*, o operon *fixABCX*, devido à presença de 3 seqüências típicas de ligação da proteína NifA localizadas à montante do sítio promotor do operon, fosse regulado por essa proteína. Para comprovar a funcionalidade desta região, foram realizadas construções com a região promotora do operon *fixABCX* (contendo duas alterações nucleotídicas no sítio de reconhecimento para o fator sigma 70) clonada no vetor pMC1403, que permite a fusão da região em estudo com o gene repórter *lacZ*. Os experimentos de determinação da atividade de expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase realizados em linhagens de *E. coli* MC1061, foram executados na presença e ausência do plasmídeo pCK3, que expressa constitutivamente a proteína NifA de *K. pneumoniae* (KENNEDY & DRUMMOND, 1985). Os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram que a funcionalidade deste promotor depende da presença e atividade da proteína NifA. Os resultados também confirmam a hipótese de que a expressão constitutiva apresentada pelo operon *fixABCX* na ausência de NifA (resultados obtidos antes das mutações – Tabela 4) eram devidos ao reconhecimento de um outro elemento promotor por parte da RNA-polimerase da bactéria *E. coli*. Também não foi detectada perda de função de IHF após a substituição dos nucleotídeos durante a mutagênese.

A presença de um promotor dependente de sigma 70, detectada através de sua atividade, deverá ser comprovada no organismo original, *A. brasilense*. Somente desta maneira se poderá concluir se este promotor é realmente funcional.

A diferença entre os níveis de transcrição nas construções pMCpfixmut + pCK3 e pMCH + pCK3 (Tabela 5) pode ser justificada pela maior eficiência do promotor dos genes *nif* estruturais (*nifHDK*). Resultados semelhantes foram encontrados quando o promotor do gene *nifE* foi comparado com o do *nifH* (POTRICH *et al.*, 2001).

Estudos específicos, através de deleções de determinadas regiões, serão realizados a fim de elucidar a funcionalidade das 3 seqüências UAS's encontradas na região promotora estudada.

#### 4.2 Função das proteínas FixABCX de *A. brasilense*

As seqüências de aminoácidos das proteínas FixABCX de *A. brasilense* apresentaram alto grau de homologia com proteínas FixABCX de outras bactérias diazotróficas (figuras 16, 17, 18 e 19). Estes polipeptídeos também apresentaram similaridade com proteínas pertencentes a uma família de flavoproteínas transportadoras de elétrons (ETF's), conforme mostrado nas figuras 20, 21, 22 e 23. São dois os componentes desta família: a ETF $\alpha\beta$ , heterodímero de duas sub-unidades (alfa e beta); e a proteína ETFQO-ubiquinona oxiredutase. Ambas são flavoproteínas com cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ligado à apoproteína, sendo que a ETFQO-ubiquinona oxiredutase ainda possui um centro de oxidação 4Fe-4S na sua estrutura. A distribuição desta família é bastante ampla, sendo encontrada tanto em procariotos, como nas bactérias ancestrais *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e *Megasphaera elsdenii*, nas bactérias diazotróficas *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium meliloti*, bem como em eucariotos, como ratos, suínos, vermes e humanos, onde este sistema tem localização mitocondrial (WEIDENHAUPT *et al.*, 1996; TSAI & SAIER, 1995).

A função desempenhada pelo sistema ETF é a de transferência de elétrons provenientes de desidrogenases primárias, principalmente relacionadas à via  $\beta$ -oxidativa dos ácidos graxos, para a cadeia respiratória. Em mamíferos, são várias as desidrogenases que vão atuar como doadoras de elétrons para o sistema ETF $\alpha\beta$ -ETFQO, entre elas, as diversas AcilCoA desidrogenases, específicas do catabolismo de aminoácidos. Sendo assim, a ETF $\alpha\beta$  localizada na matriz mitocondrial, vai ser reduzida pela ação de 2 elétrons provenientes destas desidrogenases, transferindo esses elétrons adiante para a proteína transmembrana ETFQO-ubiquinona oxiredutase. Esta, no seu centro 4Fe-4S, vai reduzir o componente ubiquinona, convertendo-o

em ubiquinol. O ubiquinol resultante levará os elétrons para seu destino final na cadeia respiratória no Complexo III-ubiquinol-citocromo C-oxireductase (ROBERTS *et al.*, 1996).

As similaridades encontradas ocorrem entre o produto do gene *fixA* e a sub-unidade  $\beta$  da proteína ETF $\alpha\beta$ ; o produto do gene *fixB* e a sub-unidade  $\alpha$  desta mesma proteína; e as proteínas FixC e FixX que, juntas, apresentam similaridade com toda a extensão da ETFQO-ubiquinona oxireductase. Tal semelhança permite a inserção dos polipeptídeos FixABCX dentro desta grande família de flavoproteínas transportadoras de elétrons.

WEIDENHAUPT *et al.* (1996) desenvolveram uma organização filogenética baseada na similaridade das seqüências de aminoácidos das proteínas desta família. Dividiram as ETF's em 2 grupos. O grupo I é formado pelas ETF's tradicionalmente relacionadas à transferência de elétrons da via  $\beta$ -oxidativa, ou outro processo catabólico como dos aminoácidos, para a cadeia respiratória. Os elementos deste grupo possuem um nível de similaridade entre si de cerca de 50% e são constitutivamente expressos, devido a sua importante função no processo catabólico geral. Como representantes tem-se a ETF $\alpha\beta$ -ETFQO humana, de *Paracoccus denitrificans* e de *Rattus norvegicus*.

O grupo II refere-se às ETF's com grau menor de identidade, aproximadamente 30%, com as tradicionais do grupo I. Pertencentes a este grupo são a ETF $\alpha\beta$ -ETFQO de *Methylophilic bacterium* W3A1, YaaQRST de *E. coli* e as proteínas codificadas pelos genes *fixABCX* de diversas bactérias diazotróficas. As proteínas do grupo II possuem a característica de serem expressas somente em condições específicas e de receberem elétrons de desidrogenases também específicas. A ETF $\alpha\beta$ -ETFQO de *Methylophilic bacterium* W3A1 é expressa quando a bactéria se multiplica em meio de cultura contendo trimetilamina como fonte de carbono, recebendo elétrons da trimetilamina desidrogenase (CHEN & SWENSON, 1994). Os genes *yaaQRST* também possuem especificidade de expressão, sendo induzidos em presença de carnitina e anaerobiose. Seu doador de elétrons seria a crotonobetaina redutase, que converte a crotonobetaina em  $\gamma$ -butirobetaina (EICHLER *et al.*, 1995; EICHLER *et al.*, 1996; WALT & KAHN, 2002). Da mesma forma, os genes de fixação do nitrogênio somente são expressos em condições específicas de microaerofilia e deficiência de amônia, embora ainda não se conheça nenhuma desidrogenase doadora para o sistema FixABCX.

Os membros da grande família ETF melhor pesquisados até o momento são a ETF $\alpha\beta$  humana e de *Paracoccus denitrificans*, que já tiveram suas estruturas tridimensionais

desvendadas por estudos de cristalografia de raios X. A ETF $\alpha\beta$  humana é estruturada em um heterodímero composto por 3 domínios, onde o primeiro e o segundo correspondem, respectivamente, a parte N-terminal e C-terminal da sub-unidade  $\alpha$ , enquanto que o 3º domínio é formado pela sub-unidade  $\beta$  (ROBERTS *et al.*, 1996).

O sítio de ligação ao FAD encontra-se em uma fenda entre as sub-unidades  $\beta$  e  $\alpha$ , sendo que a maior parte dos resíduos de aminoácidos implicados na ligação ao cofator flavínico pertencem à região C-terminal da sub-unidade  $\alpha$ . Esta região possui alto grau de conservação entre os membros da grande família ETF, inclusive em FixB de *A. brasilense*, como mostrado na figura 21, nas posições 241/244 (GKGL); 266/270 (VGVTR); 283/289 (QVGQTGK); 300/311 (GISGAIQHRVGM); 317/323 (ILAINTD); 326/329 (APIF) e 335/337 (GLV). Os aminoácidos diretamente implicados na ligação ao anel isoaloxazínico do FAD são os que possuem maior grau de conservação. São eles os resíduos R270, Q283, V284, Q286, T287 e H307, todos presentes em FixB de *A. brasilense* Sp7. A treonina na posição 287 é de extrema importância, pois a doença chamada acidúria glutárica tipo II, uma doença genética relacionada ao sistema ETF $\alpha\beta$ -ETFQO, é provocada por uma mutação nesta posição, afetando a reação oxidativa entre os dois componentes do sistema (ROBERTS *et al.*, 1996). Devido à conservação desta região C-terminal da sub-unidade  $\alpha$ , TSAI & SAIER (1995) propuseram a definição de uma seqüência “típica” da família. Esta seqüência compreende os aminoácidos: PX[L,I,V]Y[L,I,V]AXGISGX[L,I,V]QHX<sub>2</sub>G, e se encaixa perfeitamente na seqüência encontrada em FixB de *A. brasilense* na figura 21, nas posições 293/310: PKLYIAAGISGAIQHRVG.

A sub-unidade  $\beta$  da ETF humana e de *Paracoccus denitrificans* possui pelo menos duas regiões a serem consideradas. Uma delas, os 89 primeiros aminoácidos da região N-terminal, pode estar relacionada ao contato com a proteína ETFQO-ubiquinona oxireductase, componente seguinte do sistema (ROBERTS *et al.*, 1999). A proteína FixA de *A. brasilense* possui bom nível de homologia na sua região N-terminal com a mesma região da sub-unidade  $\beta$  das ETF's (figura 20). Na sub-unidade  $\beta$  da ETF $\alpha\beta$  humana, alguns resíduos de aminoácidos estão envolvidos na ligação ao AMP. Os aminoácidos implicados neste contato estão localizados nas posições 128/147 e correspondem à seqüência GKQAIDDDCNQTGQMTAGFL, sendo que os resíduos sublinhados estão diretamente relacionados ao contato com o AMP. Outras ETF's mais ancestrais, como a pertencente à bactéria *Megasphaera elsdenii*, não ligam AMP à sua sub-

unidade  $\beta$ , mas possuem afinidade por dinucleotídeo como NADH ou até FAD (O'NEILL *et al.*, 1998). A seqüência de aminoácidos encontrada nesta região em *M. elsdenii* compreende os resíduos GKQAIDGDTAQVGPQIACEL, parcialmente conservada entre os polipeptídeos FixA dos diazotróficos, incluindo *A. brasilense* Sp7, que possui a seqüência GKQTVGDGDTAQVGPGIATRL. Isto sugere a possível existência de um centro de oxiredução na proteína FixA, contendo um dinucleotídeo, possivelmente NADH, sugerindo um parentesco dos genes *fixAB* com estas ETF's mais antigas (GROSS, 1999). TSAI & SAIER (1995) propuseram uma seqüência "típica" da sub-unidade  $\beta$ , correspondente aos aminoácidos: VXR<sub>2</sub>[E,D]X<sub>3</sub>[E,Q]X[L,I,V]X<sub>3</sub>LP[C,A][L,I,V]<sub>2</sub>, diferindo em apenas um aminoácido da seqüência encontrada em *A. brasilense*: VHRRSEGGVQVLKTALPCMI.

Os três domínios que formam o corpo da proteína ETF $\alpha\beta$  são relativamente conservados, enquanto que regiões menos relevantes, como a cadeia polipeptídica de função meramente conectiva entre os domínios I e II, não são conservadas (ROBERTS *et al.*, 1999). Estas evidências indicam que as proteínas FixA e FixB formam um heterodímero com um centro de oxiredução contendo um cofator FAD na região C-terminal de FixB e outro possível sítio de ligação à dinucleotídeo, supostamente NADH, localizado na região central de FixA, exercendo também um papel oxiredutivo na transferência de elétrons no sistema FixABCX.

As proteínas FixC e FixX, por sua vez, possuem homologia com a proteína ETFQO-ubiquinona oxiredutase. Esta proteína é descrita como estando ancorada à membrana mitocondrial dos mamíferos, recebendo elétrons da ETF $\alpha\beta$  e repassando-os para o carreador ubiquinona. Dois cofatores de oxiredução estão relacionados à atividade da ETFQO. Um componente flavina adenina dinucleotídeo, que interagiria com o FADH<sub>2</sub> da ETF $\alpha\beta$ , sendo reduzido por este; e um centro 4Fe-4S responsável por repassar os elétrons provenientes do primeiro FAD para a ubiquinona (WEIDENHAUPT *et al.*, 1996).

Embora tenha-se um menor conhecimento relativo à proteína ETFQO em comparação ao componente ETF $\alpha\beta$ , é possível, através da comparação da seqüência de aminoácidos, propor a função de determinadas regiões específicas. Duas destas seriam candidatas à ligação ao FAD. A primeira encontra-se na região N-terminal da proteína, estendendo-se do resíduo D70 até A84 (figura 22), apresentando a estrutura típica GXGXXG (posições 75/80), ligante ao AMP do FAD. Esta mesma estrutura também está presente na região N-terminal dos polipeptídeos FixC de diversas bactérias diazotróficas, inclusive em *A. brasilense* Sp7, como mostrado na figura 22.

Um outro proposto sítio de interação com o AMP do FAD começaria na posição E150 da ETFQO humana, mas esta região não encontra similaridade com qualquer das proteínas FixC diazotróficas (GOODMAN *et al.*, 1994).

A região C-terminal da proteína ETFQO possui um centro 4Fe-4S, representado pelo motivo de 3 cisteínas CXXCXXC, encontrado nas posições 610/616 da figura 23 (GOODMAN *et al.*, 1994). Normalmente, estes centros de oxiredução possuem ainda uma quarta cisteína distanciada do agrupamento descrito, como é o caso da ETFQO que possui esta cisteína localizada na posição 584, fazendo parte da seqüência característica CPA. As proteínas FixX dos organismos diazotróficos, entre eles *A. brasilense*, apresentam o grupamento CXXCXXC na sua porção C-terminal e a seqüência CPA distanciada das 3 cisteínas. Portanto, estas evidências sugerem que o último componente do sistema FixABCX seja uma proteína 4Fe-4S.

Os dois componentes, FixC e FixX de *A. brasilense*, juntos, teriam uma estrutura semelhante à ETFQO-ubiquinona oxiredutase (GOODMAN *et al.*, 1994; WEIDENHAUPT *et al.*, 1996).

Existe, portanto, uma nítida correlação entre a cadeia ETF $\alpha\beta$ -ETFQO e o sistema diazotrófico FixABCX, o que leva à sugestão de que estas proteínas desempenham uma função de transporte de elétrons no processo de fixação biológica do nitrogênio.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, O. M.; REILÄNDER, H.; ARNOLD, W. & PÜHLER, A. *Rhizobium meliloti* *nifN* (*fixX*) gene is part of an operon regulated by a *nifA*-dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to the *nifK* gene product. **J. Bacteriol.**, 169: 5393-5400, 1987.

AHOMBO, G.; WILLISON, J. C. & VIGNAIS, P. M. The *nifHDK* genes are contiguous with a *nifA*-like regulatory gene in *Rhodobacter capsulatus*. **Mol. Gen. Genet.**, 205: 442-445, 1986.

ALVAREZ-MOALES, A. & HENNECKE, H. **Mol. Gen. Genet.**, 199: 306-314, 1985.

ALVAREZ-MORALES, A.; BETANCOURT-ALVAREZ, M.; KALUZA, K. & HENNECKE, H. Activation of the *Bradyrhizobium japonicum* *nifH* and *nifDK* is dependent on promoter-upstream DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, 14: 4207-4227, 1986.

ARAÚJO, E. F. Caracterização de segmentos de DNA adjacentes aos genes *nifHDK* de *Azospirillum brasilense* Sp7 por mutagênese em sítio direcionado com transposon Tn5. Porto Alegre, RS; Tese de Doutorado, Departamento de Genética, UFRGS, 1988.

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.**, 225: 514-520, 1991.

ARIGONI, F.; KAMINSKI, P. A.; CELLI, J. & ELMERICH, C. Transcriptional analysis of the *fixABCXORF1* region of the *Azorhizobium caulinodans* suggests posttranscriptional processing of the *fixABCXORF1* mRNA. **Mol. Gen. Genet.**, 235: 422-431, 1992.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, O. & PÖHLER, A. Nucleotide sequence of a 24206 base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Mol. Microbiol.**, 203: 715-738, 1988.

ARSÉNE, 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.**, 178: 4830-4838, 1996.

ATLAS, R. M. & BARTHA, R. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Addison-Wesley, Reading, 1981.

AUSTIN, S.; HENDERSON, N. C. & DIXON, R. A. Characterization of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NifA and NifL *in vitro*. **Eur. J. Biochem.**, 187: 353-360, 1990.

AUSUBEL, F. M. Regulation of nitrogen fixation genes. **Cell**, 37: 5-6, 1984.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biol. Fertil. Soils**, 4: 37-40, 1987.

BANFALVI, Z.; SAKANYAN, V.; KONCZ, C.; KISS, A.; DUSHA, I. & KONDOROSI, A. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. **Mol. Gen. Genet.**, 184: 318-325, 1981.

BARBIERI, P.; ZANELLI, T.; GALLI, E. & ZANETTI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiol. Lett.**, 36: 87-90, 1986.



BASHAN, Y.; SINGH, M. & LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd. to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Can. J. Bot.**, 67: 2429-2434, 1989.

BERGER, D.; NARBERHAUS, F. & KUSTU, S. The isolated catalytic domain of NifA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription in vitro: activation is inhibited by NifL. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 103-107, 1994.

BETTER, M.; DITTA, G. & HELINSKI, R. Deletion analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters. **The EMBO Journal**, 4: 2419-2424, 1985.

BIRNBOIM, H. C. & DOYLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, 7: 1513-1524, 1979.

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant Soil**, 95: 109-121, 1986.

BOZOUKLIAN, H. & ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. **Biochimie**, 68: 1181-1187, 1986.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W. & JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Chapter 16 – Nitrogen and Sulfur. American Society of Plant Physiologists, 2000.

BUCK, M. & CANNON, W. Mutations in the RNA polymerase recognition sequence of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter permitting transcriptional activation in the absence of NifA-binding to upstream activator sequence. **Nucleic Acids Research**, 17: 2597-2612, 1989.

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

CANNON, W. V.; CHARLTON, W. L. & BUCK, M. Organization and function of binding sites for the transcriptional activator NifA in the *Klebsiella nifE* and *nifU* promoters. **J. Mol. Biol.**, 220: 915-931, 1991.

CASADABAN, M. J.; MARTINEZ-ARIAS, A.; SHAPIRA, S. K. & CHOU, J.  $\beta$ -galactosidase gene fusion for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. **Methods in Enzymology**, 100: 293-308, 1983.

CEBOLLA, A.; BERRAQUERO, F. R. & PALOMARES, A. J. Analysis of the expression from *Rhizobium meliloti fix*-promoters in other *Rhizobium* backgrounds. **Microbiology**, 140: 443-453, 1994.

CHARLTON, W. L.; CANNON, W. & BUCK, M. The *Klebsiella pneumoniae nifJ* promoter: analysis of promoter elements regulating activation by the NifA promoter. **Mol. Microbiol.**, 7: 1007-1021, 1993.

CHEN, D. & SWENSON, R. P. Cloning, sequence analysis and expression of the genes encoding the two subunits of the *Methylotrophic bacterium* W3A1 electron transfer flavoprotein. **J. Biol. Chem.**, 269: 32120-32130, 1994.

DEAN, D. R.; BOLIN, J. T. & ZHENG, L. Nitrogenase metalloclusters: structures, organization and synthesis. **J. Bacteriol.**, 175: 6737-6744, 1993.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A. & ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, 175: 2507-2515, 1993.

DIXON, R. A.; EADY, R. R.; ESPIN, G.; HILL, S.; IACCARINO, M.; KAHN, D. & MERRICK, M. Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation gene (*nif*) cluster with gene fusions. **Nature**, 286: 128-132, 1980.

DIXON, R. A. The genetic complexity of nitrogen fixation. **J. Gen. Microbiol.**, 130: 2745-2755, 1984.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. & SCHLEIFER, K. H. (eds.) *The Prokaryotes*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, New York, 1992.

DUSHA, I.; KOVALENKO, S.; BANFALVI, Z. & KONDOROSI, A. *Rhizobium meliloti* insertion element ISRM2 and its use for identification of the *fixX* gene. **J. Bacteriol.**, 169(4): 1403-1409, 1987.

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.**, 169(3): 1127-1136, 1987.

EBELING, S.; HAHN, M.; FISHER, H. M. & HENNECKE, H. Identification of *nifE*, *nifN* and *nifS*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **Mol. Gen. Genet.**, 207: 503-508, 1987.

EDWARDS, R. A. & MERRICK, M. J. The role of uridylyltransferase in the control of *Klebsiella pneumoniae* *nif* gene regulation. **Mol. Gen. Genet.**, 247: 189-198, 1995.

EICHLER, K.; BUCHET, A.; BOURGIS, F.; KLEBER, H. P. & MANDRAND-BERTHELOT, M. A. The *fix* *Escherichia coli* region contains four genes related to carnitine metabolism. **J. Basic Microbiol.**, 35(4): 217-227, 1995.

EICHLER, K.; BUCHET, A.; LEMKE, R.; KLEBER, H. P. & MANDRAND-BERTHELOT, M. A. Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a

potential transcriptional activator of carnitine metabolism en *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, 178(5): 1248-1257, 1996.

FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: *Azospirillum/Plant Associations* (Okon, Y., Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 87-109, 1994.

FANI, R.; BANDI, C.; BAZZICALUPO, M.; CECCHERINI, M. T.; FANCELLI, S.; GALLORI, E.; GERACE, L.; GRIFONI, A.; MICLAUS, N. & DAMINI, G. Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, 129: 195-200, 1995.

FOGHER, C.; DUSHA, I.; BARBOT, P. & ELMERICH, C. Heterologous hybridization of *Azospirillum* DNA to *Rhizobium nod* and *fix* genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, 30: 245-249, 1985.

FRAZZON, J. Caracterização dos genes *nif* envolvidos no processo de ativação ou estabilização catalítica do componente Fe-proteína da nitrogenase de *Azospirillum brasilense* Sp7. Porto Alegre, RS; Dissertação de Mestrado, CPG-Bioquímica, UFRGS, 1991.

FRAZZON, J. Regulação e expressão dos genes *nifUSV* de *Azospirillum brasilense* Sp7. Porto Alegre, RS; Tese de Doutorado, CPG-Bioquímica, UFRGS, 1996.

FRAZZON, J. & SCHRANK, I. S. Sequencing and complementation analysis of the *nifUSV* genes from *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 159: 151-158, 1998.

FU, H. A.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; ROBERTS, G. P. & BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, 171: 4679-4685, 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.**, 199: 315-322, 1985.

GALIMAND, M.; PERROUD, B.; DELORME, F.; PAQUELIN, A.; VIEILLE, C.; BOZOUKLIANS, H. & ELMERICH, C. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifUS* and *fixABC* in *Azospirillum brasilense* Sp7. **J. Gen. Microbiol.**, 135: 1047-1059, 1989.

GASKINS, M. H.; UMALI-GARCIA, M.; TIEN, T. M. & HUBBELL, D. H. Nitrogen fixation and growth substance produced by *Spirillum lipoferum* and their effects on plant growth. **Plant Physiology**, 59 (suplemento): 128, 1977.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can. J. Microbiol.**, 41: 109-117, 1995.

GOODMAN, S. I.; AXTELL, K. M.; BINDOFF, L. A.; BEARD, S. E.; GILL, R. E. & FRERMAN, F. E. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding human electron transfer flavoprotein – ubiquinone oxidoreductase. **Eur. J. Biochem.**, 219: 277-286, 1994.

GOSINK, M.; FRANKLIN, N. M. & ROBERTS, G. P. The product of the *Klebsiella pneumoniae* *nifX* gene is a negative regulator of the nitrogen fixation (*nif*) regulon. **J. Bacteriol.**, 172: 1441-1447, 1990.

GROSS, J. Caracterização do operon *fixABCX* de *Azospirillum brasilense* Sp7. Porto Alegre, RS; Monografia de Bacharelado, Curso de Farmácia, UFRGS, 1999.

GUBLER, M. & HENNECKE, H. Regulation of the *fixA* gene and *fixBC* operon in *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.**, 170(3): 1205-1214, 1988.

GUBLER, M.; ZÜRCHER, T. & HENNECKE, H. The *Bradyrhizobium japonicum* *fixBCX* operon: identification of *fixX* and of a 5' mRNA region affecting the level of the *fixBCX* transcript. **Mol. Microbiol.**, 3(2): 141-148, 1989.

GUBLER, M. Fine-tuning of *nif* and *fix* gene expression by upstream activator sequences in *Bradyrhizobium japonicum*. **Mol. Microbiol.**, 3(2): 149-159, 1989.

GUSSIN, G. N.; RONSON, C. W. & AUSUBEL, F. M. Regulation of nitrogen fixation genes. **Ann. Rev. Genet.**, 20: 567-591, 1986.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.** 41:95-98, 1999.

HARTMANN, A. & ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum/Plant Associations* (Okon, Y., Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 15-39, 1994.

HASELKORN, R. Organization of the genes for nitrogen fixation in photosynthetic bacteria and cyanobacteria. **Ann. Rev. Microbiol.**, 40: 525-547, 1986.

HASELKORN, R.; GOLDEN, J. W.; LAMMERS, P. J. & MULLIGAN, M. E. Rearrangement of *nif* genes during cyanobacterial heterocysts differentiation. **Phil. Trans. Royal. Soc. Lon.**, 317: 173-181, 1987.

HILL, S. How is nitrogenase regulated by oxygen? **FEMS Microbiol. Rev.**, 54: 111-130, 1988.

HILL, S.; KENNEDY, C.; KAVANAGH, E.; GOLDBERG, R. B. & HANAU, R. Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, 290: 424-426, 1981.

HILL, S.; VIOLLET, S.; SMITH, A. T. & ANTHONY, C. Roles for enteric d-type cytochrome oxidase in N<sub>2</sub> fixation and microaerobiosis. **J. Bacteriol.**, 172: 2071-2078, 1990.

HOMER, M. J.; PAUSTIAN, T. D.; SHAH, V. K. & ROBERTS, G. P. The *nifY* product of *Klebsiella pneumoniae* is associated with apodinitrogenase and dissociates upon activation with the iron-molybdenum cofactor. **J. Bacteriol.**, 175: 4907-4910, 1993.

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**, 63: 11-22, 1990.

HOWARD, J. B. & REES, D. C. Nitrogenase, a nucleotide dependent molecular switch. **Ann. Rev. Biochem.**, 63: 235-264, 1994.

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.**, 261: 772-778, 1986.

JACOBSON, M. R.; BRIGLE, K. E.; BENNETT, L. T.; SETTERQUIST, R. A.; WILSON, M. S.; CASH, V. L.; BEYNON, J. L.; NEWTON, W. E. & DEAN, D. R. Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, 171: 1017-1027, 1989a.

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.**, 219: 49-57, 1989b.

JONES, R.; WODLEY, P. & ROBSON, R. Cloning and characterization of some genes for nitrogen fixation from *Azotobacter chroococcum* and their expression in *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, 197: 318-327, 1984.

KAMINSKI, P. A.; NOREL, F.; DESNOUES, N.; KUSH, A.; SALZANO, G. & ELMERICH, C. Characterization of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 and identification of a new nitrogen fixation gene. **Mol. Gen. Genet.**, 214: 496-502, 1988.

KENNEDY, C.; & DRUMMOND, M. H. Use of cloned *nif* regulatory elements from *Klebsiella pneumoniae* to examine *nif* regulation in *Azotobacter vinelandii*. **J. Gen. Microbiol.**, 131: 1787-1795, 1985.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D. & KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.**, 140: 679-693, 1989.

KIM, J. & REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, 33: 389-397, 1994.

LAMM, R. B. & NEYRA, C. A. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. **Can. J. Microbiol.**, 27: 1320-1325, 1981.

LEHNINGER, A. L. Bioquímica, vol.1; 2<sup>a</sup> ed. São Paulo. Editora Edgar Blücher LTDA, 1976.

LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A. & ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Mol. Microbiol.**, 5(11): 2735-2744, 1991.



LIANG, Y. Y.; DE ZAMAROCZY, M.; ARSÈNE, F.; PAQUELIN, A. & ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation genes in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of the *nifA*, *glnB* and *glnA* products. **FEMS Microbiol. Lett.**, 100: 113-120, 1992.

LIN, W.; OKON, Y. & HARDY, R. W. F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 45: 1775-1779, 1983.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 55: 417-430, 1983.

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

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. **Methods in Enzymology**, 101: 20-78, 1983.

MILLCAMPS, A.; KEYERS, V. & VANDERLEYDEN, J. Identification of a *nifW*-like gene in *Azospirillum brasilense*. **Biochim. Biophys. Acta**, 1173: 237-238, 1993.

MORTENSON, L. Structure and function of nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, 48: 387-418, 1979.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K. & BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **Plant Cell**, 7: 869-885, 1995.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. Jr. & DEERFIELD, D. W. GeneDoc: Analysis and Visualization of genetic Variation, **EMBNEW. NEWS**, 4:14, 1997.

O'NEILL, H.; MAYHEW, S. G. & BUTLER, G. Cloning and analysis of the genes for a novel electron-transfer flavoprotein from *Megasphaera elsdenii*: expression and characterization of the recombinant protein. **J. Biol. Chem.**, 273(33): 21015-21024, 1998.

OW, D. W. & AUSUBEL, F. M. Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, 301: 397-413, 1983.

PASSAGLIA, L. M. P.; NUNES, C. P.; ZAHA, A. & SCHRANK, I. S. The *nifHDK* operon in the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises genes *H*, *D*, *K*, an 353 bp *ORF* and gene *Y*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 24: 649-675, 1991.

PASSAGLIA, L. M. P.; SCHRANK, A. & SCHRANK, I. S. The two overlapping *Azospirillum brasilense* upstream activator sequences have differential effects on *nifH* promoter activity. **Can. J. Microbiol.**, 41: 849-854, 1995.

PASSAGLIA, L. M. P.; SOOM, C. V.; SCHRANK, A. & SCHRANK, I. S. Purification and binding analysis of the nitrogen fixation regulatory NifA protein from *Azospirillum brasilense*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31: 1363-1374, 1998.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J. & JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Can. J. Microbiol.**, 29: 900-915, 1983.

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

PEDROSA, F. O. Fixação Biológica do Nitrogênio: fértil idéia. **Ciência Hoje**, 6 (32): 12-13, 1987.

PETERS, J. W.; FISHER, K. & DEAN, D. R. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. **Ann. Rev. Microbiol.**, 49: 335-366, 1995.

POTRICH, D. P. Estudo da região de DNA envolvida na regulação da expressão dos genes *nifENX* de *Azospirillum brasilense*. Porto Alegre, RS; Monografia de Bacharelado, Curso de Ciências Biológicas, ênfase em Genética, UFRGS, 1997.

POTRICH, D. P.; BRESSEL, T. A.; SCHRANK, I. S. & PASSAGLIA, L. M. P. Sequencing and promoter analysis of the *nifENXorf3orf5fdxAnifQ* operon from *Azospirillum brasilense* Sp7. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34: 1379-1395, 2001.

QUIVIGER, B.; FRANCHE, C.; LUTFALLA, G.; RICE, D.; HASELKORN, R. & ELMERICH, C. Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. **Biochimie**, 64: 495-502, 1982.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S. & DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 37: 43-51, 1987.

ROBERTS, D. L.; FRERMAN, F. E. & KIM, J. J. P. Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 14355-14360, 1996.

ROBERTS, D. L.; SALAZAR, D.; FULMER, J. P.; FRERMAN, F. E. & KIM, J. S. Crystal structure of *Paracoccus denitrificans* electron transfer flavoprotein: structural and electrostatic analysis of a conserved flavin binding domain. **Biochemistry**, 38: 1977-1989, 1999.

ROBSON, R. L. & POSTGATE, J. R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. **Ann. Rev. Microbiol.**, 34: 183-207, 1980.

ROELVINK, P. W.; HARMSSEN, M.; KAMMEN, A. & VAN DEN BOS, R. C. The *nifH* promoter region of *Rhizobium leguminosarum*: nucleotide sequence and promoter elements controlling activation by NifA protein. **Gene**, 87: 31-37, 1990.

RUVKUN, G. B.; SUNDARESAN, V. & AUSUBEL, F. M. Directed transposon Tn-5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. **Cell**, 29: 551-559, 1983.

SADASIVAN, L. & NEYRA, C. A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. **J. Bacteriol.**, 163: 716-723, 1985.

SADASIVAN, L. & NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC29145. **J. Bacteriol.**, 169: 1670-1677, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTERO, E.; HOOVER, T. R.; NORTH, A. K.; BERGER, D. K.; PORTER, S. & KUSTU, S. Role of Integration Host Factor in stimulating transcription from the  $\sigma^{54}$ -dependent *nifH* promoter. **J. Mol. Biol.**, 227: 602-620, 1992.

SARIG, S.; BLUM, A. & OKON, Y. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **J. Agric. Sci. Camb.**, 110: 271-277, 1988.

SCHRANK, I. S.; ZAHA, A.; ARAÚJO, E. F. & SANTOS, D. S. Construction of a gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a recombinant containing the *nif* structural genes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 20: 321-330, 1987.

SHINGLER, V. Signal sensing by  $\sigma^{54}$ -dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Mol. Microbiol.**, 19 (3): 409-416, 1996.

SMITH, R. L.; BOUTON, J. H.; SCHANK, S. C.; QUESENBERRY, K. H.; TYLER, M. E.; MILAM, J. R.; GASKINS, M. H. & LITTELL, R. C. Nitrogen fixation in grasses inoculated with *Spirillum lipoferum*. **Science**, 193: 1003-1005, 1976.

SPEROTTO, R. A.; PASSAGLIA, L. M. P. & SCHRANK, I. S. Análise da ativação da transcrição do operon *fixABCX* de *Azospirillum brasilense* quanto à presença da proteína NifA. In: 48º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, 2002.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.**, 24: 487-506, 2000.

STRYER, L. Bioquímica. 3ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A., 1992.

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

TAL, S. & OKON, Y. Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. **Can. J. Microbiol.**, 31: 608-613, 1985.

TAL, S.; SMIRNOFF, P. & OKON, Y. The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation. **J. Gen. Microbiol.**, 136: 1191-1196, 1990.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R. & DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) sp. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.**, 24: 967-980, 1978.

THÖNY, B. & HENNECKE, H. The -24/-12 promoter comes of age. **FEMS Microbiol. Rev.**, 63: 341-358, 1984.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H. & HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Appl. Environ. Microbiol.**, 37: 1016-1020, 1979.

TSAI, M. H. & SAIER, M. H. Phylogenetic characterization of the ubiquitous electron transfer flavoprotein families ETF- $\alpha$  and ETF- $\beta$ . **Res. Microbiol.**, 146: 397-404, 1995.

UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H. & DAZZO, F. B. Association of *Azospirillum* with grass roots. **Appl. Environ. Microbiol.**, 39: 219-226, 1980.

VANDE BROEK, A.; MICHIELS, J.; VANGOOL, A. & VANDERLEYDEN, J. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 6(5): 1-9, 1993.

VANDE BROEK, A. & VANDERLEYDEN, J. Review: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Crit. Ver. Plant Sci.**, 14: 445-466, 1995.

VEDOY, C. G. Análise das regiões adjacentes ao operon *nifUSV* em *Azospirillum brasilense* Sp7. Porto Alegre, RS; Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, 1995.

VON BULOW, J. G. D. & DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 72: 2389-2393, 1975.

WALT, A. & KAHN, M. L. The *fixA* and *fixB* genes are necessary for anaerobic carnitine reduction in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, 184: 4044-4047, 2002.

WEIDENHAUPT, M.; ROSSI, P.; BECK, C.; FISCHER, H. M. & HENNECKE, H. *Bradyrhizobium japonicum* possesses two discrete sets of electron transfer flavoprotein genes: *fixA*, *fixB* and *etfS*, *etfL*. **Arch. Microbiol.**, 165: 169-178, 1996.

WEINSTEIN, M.; LOIS, A. F.; DITTA, G. S. & HELINSKI, D. R. Mutants of the two-component regulatory protein *fixJ* of *Rhizobium meliloti* that have increased activity at the *nifA* promoter. **Gene**, 134: 145-152, 1993.

WIJNTJENS, R.; VAN DONGEN, W. & HAAKER, H. Molecular cloning of *fixA*, *fixB*, *fixC* and *fixX* genes of *Azotobacter vinelandii*. Dados não-publicados. GenBank. Número de Acesso: G510483, 1992.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W. & ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, 175: 6781-6788, 1993.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W. & ROBERTS, G. P. Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. **J. Bacteriol.**, 178: 2948-2953, 1996.

ZIMMERMAN, J. L.; SZETO, W. W. & AUSUBEL, F. M. Molecular characterization of Tn-5 induced symbiotic (Fix<sup>-</sup>) mutants of *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, 156(3): 1025-1034, 1983.