

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

O MECANISMO DE REGULAÇÃO DA FBN E SUA DIVERSIDADE

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

O MECANISMO DE REGULAÇÃO DA FBN E SUA DIVERSIDADE

K.R. dos S. Teixeira

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**

Embrapa-CNPAB. Documentos, 40

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à
Embrapa-CNPAB
Antiga Rodovia Rio/São Paulo
Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500
Telex: (21) 32723 EBPA
Fax: (021)682-1230
Caixa Postal 74505
23851-970 Seropédica, RJ

Comitê de Publicações

Helvécio De-Polli(Presidente)
Johanna Döbereiner
José Ivo Baldani
Paulo Augusto da Eira
Norma Gouveia Rumjanek
Sebastião Manhães Souto
Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

TEIXEIRA, K.R. dos S. **O mecanismo de regulação da FBN e sua diversidade.**
Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 25p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 40).

1. Fixação biológica de nitrogênio (FBN). 2. Genética. 3. Genes. I. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). II. Título. III. Série.

CDD 572.545

© Embrapa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1. Regulação da FBN no grupo dos rizóbios.....	6
1.2 - Regulação da FBN em Azospirillum brasilense.....	10
1.3 - Regulação da FBN em Herbaspirillum seropedicae	13
1.4 - Regulação da FBN em Acetobacter diazotrophicus.....	15
2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

O MECANISMO DE REGULAÇÃO DA FBN E SUA DIVERSIDADE

K.R. dos S. Teixeira¹

1. INTRODUÇÃO

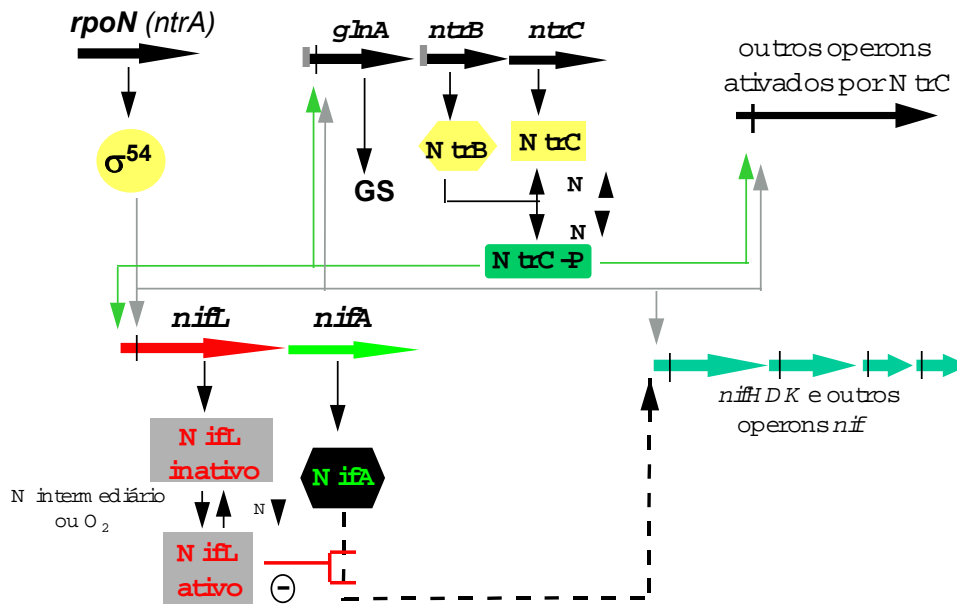
A regulação da fixação biológica de nitrogênio(FBN) é um mecanismo complexo que ocorre em resposta a disponibilidade de fontes de nitrogênio combinado e a concentração de oxigênio presente (Buchanan-Wollaston et al., 1981). O envolvimento dos genes *ntrBC* no processo de regulação da FBN em *K. pneumoniae* só foi esclarecido no início da década de 80 pela descoberta de regiões codificadoras próxima ao gene *glnA*, o qual até então se postulava deveria exercer papel de regulador da expressão da FBN dependente da concentração de amônia (Espin et al., 1982). Considerando que a nitrogenase é altamente sensível ao oxigênio, devido à disposição do centro 4Fe-4S da proteína Fe e pelo seu caráter redutor (Morgan et al., 1990), a regulação da expressão dos genes *nif* em altas concentrações de oxigênio (inibitórias da atividade da nitrogenase) é essencial para a eficiência desse processo. A regulação da FBN pode ocorrer em três níveis: ao nível de transcrição, pós-tradução e compartimentalização.

Em *K. pneumoniae*, dentre os 20 genes estudados (ver revisão Teixeira, 1997b), foram identificados dois genes responsáveis pela regulação da FBN ao nível de transcrição, os genes *nifA* e *nifL* (Dixon et al., 1977; Kennedy, 1977). Em geral, a fixação de nitrogênio apresenta um mecanismo de regulação positiva e específica ao nível de transcrição dependente do produto do gene *nifA*. O gene *nifA* codifica para uma proteína capaz de identificar regiões promotoras a 5' de outros genes *nif* (ou operons *nif*) permitindo então a ação da RNA polimerase acoplada a um fator sigma alternativo, o qual tem sido encontrado na literatura com diferentes nomenclaturas tal como σ^N , σ^{54} , RpoN ou NtrA (Buchanan-Wollaston et al., 1981; Taylor, et al., 1996). Além dessa regulação específica, o estudo da regulação da transcrição dos genes *nif* em *K.*

¹ Biológa, PhD., Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, km 47, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970, Seropédica, RJ

pneumoniae revelou que a ativação da transcrição do gene *nifA* é dependente do reconhecimento da região promotora do operon *nifLA* pelo produto do gene *ntrC*-fosforilado, em condições limitantes de N (Espin et al., 1982; Dixon et al., 1987), como representado na figura 1.

Figura 1 - Mecanismo de Regulação em *K. pneumoniae*.



Em *A. vinelandii*, onde foi observado a presença de sistemas alternativos da nitrogenase (ver revisão de Teixeira, 1997b) verificou-se que o produto do gene *ntrC* não é essencial para a expressão do operon *nifLA* (Blanco et al, 1993; Raina et al., 1993) nem dos genes *vnfA* ou *anfA*, ativador dos genes para nitrogenases V e Fe-dependente (Walmsley et al., 1994). Entretanto, segundo estes autores o fenótipo observado no duplo mutante *ntrCnifA*⁻ sugere que o produto do gene *ntrC* deve desempenhar um papel relevante para fixação de N₂, provavelmente ativando a transcrição do gene *nifM* mesmo na ausência da proteína NifA.

O estabelecimento do mecanismo de regulação em cascata dos genes *nif* em *K. pneumoniae* levou diversos autores a proporem mecanismos semelhantes para *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (Pedrosa & Yates, 1984; Souza 1990; Souza et al., 1991). Entretanto, estudos mais detalhados de mutantes regulatórios e da seqüência de bases da

região contendo o *nifA* tem permitido a elucidação do mecanismo de regulação em outros diazotrofos.

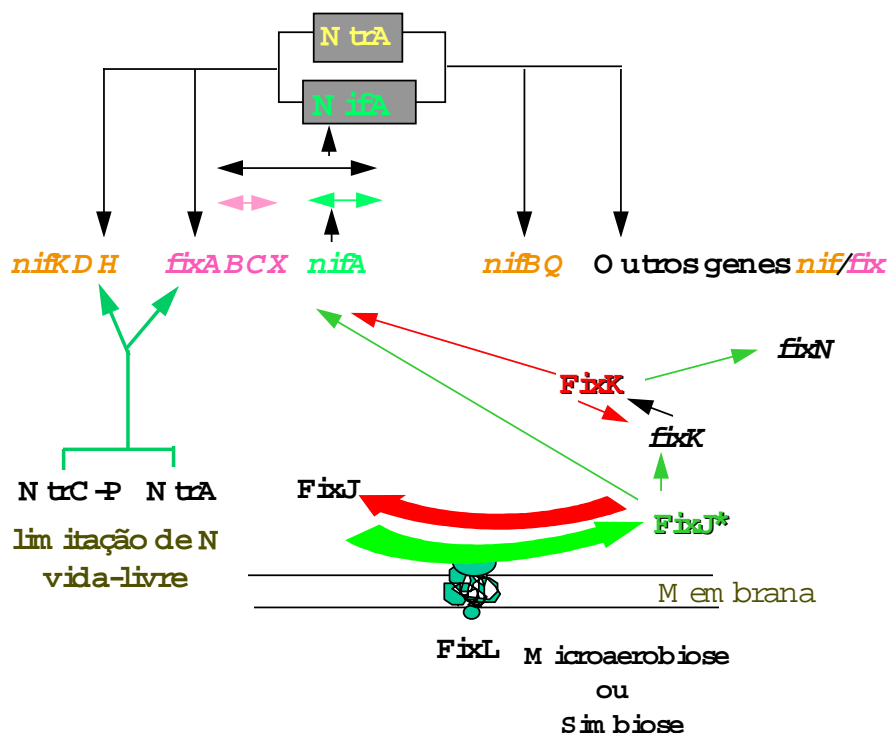
1.1. Regulação da FBN no grupo dos rizóbios

O estudo do mecanismo de regulação da FBN em diazotrofos do tipo simbiótico permitiu estabelecer que genes do sistema *ntr* não desempenham necessariamente papel essencial para a regulação da FBN, como observado em *K. pneumoniae*. A presença de promotores do tipo -24/-12 e seqüências ativadoras a 5' (Upstream Activator Sequence - reconhecidas como sítios para ligação da proteína NifA) em regiões promotoras dos genes *nif* e *fix* foram as primeiras evidências de que nesse grupo de diazotrofos de caráter simbiótico a FBN é dependente dos produtos dos genes *rpoN* (*ntrA*) e *nifA* (Gussin et al., 1986). Por outro lado, Szeto et al. (1987) observaram que a transcrição do gene *ntrC* em *Sinorhizobium meliloti* (nov. class. de *Rhizobium meliloti* – De Lajudie et al., 1994), quando crescido sob condições limitantes de N, é acompanhada pelo acúmulo de mRNA correspondentes aos genes *nifHDK*, *fixABC*, *nifA* e *nifB*. Entretanto, os autores (Szeto et al., 1987) concluíram que o envolvimento do gene *ntrC* não é essencial para a FBN em simbiose considerando que mutantes *ntrC* de *S. meliloti* foram capazes de produzirem nódulos eficientes em alfafa (*Medicago sativa*).

Os genes *fix*, descritos inicialmente em diazotrofos do grupo dos rizóbios, desempenham um papel essencial para a FBN principalmente no mecanismo de regulação da transcrição dos genes *nif*. O operon *fixLJ* em *S. meliloti* codifica produtos que são essenciais para a fixação de nitrogênio simbiótica e respiração anaeróbica do nitrato, e além disso diversos autores observaram que o produto desses genes constituem um sistema de dois componentes responsável pela regulação da expressão dos genes *nif/fix* em resposta a baixos níveis de oxigênio (David et al., 1988; Hertig et al., 1989; Batut et al., 1985, 1989; de Philip et al., 1990; Giles-Gonzales et al., 1991). Acredita-se que diazotrofos do grupo dos rizóbios na forma de bacteróides são supridos pela planta hospedeira com variedades de fontes de carbono para produção de ATP e equivalentes redutores para facilitar a FBN em benefício da planta. Portanto, de Bruijn et al. (1990) postularam que neste grupo de diazotrofos os genes *nif* e *fix* não devem estar sujeitos a

regulação dependente de N. Entretanto, redução na fixação de nitrogênio havia sido observada em plantas de alfafa noduladas com *S. meliloti* após adição de N-combinado (revisado por Streeter, 1988). Durante estudo sobre a influência de diversas fontes de N na fixação de nitrogênio, Noonan et al. (1992) observaram que, em condições de vida-livre em microaerobiose, a presença de amônia inibe a expressão de genes *nif* em *S. meliloti* através de um mecanismo que envolve os produtos dos genes *fixLJ*. Os autores observaram que o efeito inibitório da amônia sobre a expressão de fusões *nifA-lacZ* não dependem da sua assimilação uma vez que os produtos derivados desse processo, glutamato e glutamina, não exerceram nenhum efeito sobre a expressão da fixação de nitrogênio. A avaliação da expressão de fusões *nifA-lacZ* em mutantes *fixK* e *ntnC* revelou que a expressão, em ambos os mutantes assim como no selvagem, foi baixa na presença de amônia como única fonte de N. Este fato indicou que, apesar do produto do gene *fixK* ser conhecido como regulador negativo da expressão do gene *nifA* e de si próprio (Batut et al., 1989), a proteína FixK não é essencial para a inibição da expressão do gene *nifA* em resposta a presença de amônia (Noonam et al., 1992). Por outro lado, o efeito inibitório da amônia não foi observado sobre a expressão da fusão *nifA-lacZ* em mutantes *fixL*. Noonan et al. (1992) considerando que em *S. meliloti* o produto do gene *fixL* funciona como uma proteína sensora ao nível de membrana responsável pela modulação da proteína FixJ, regulador positivo da expressão do gene *nifA* (David et al., 1988; Hertig et al., 1989), sugerem o envolvimento da proteína FixL no processo de regulação negativa dependente de amônia da expressão do gene *nifA* (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo de regulação em *Sinorhizobium meliloti*.



Em *Bradyrhizobium japonicum* os genes *fixLJ* não estão envolvidos na regulação do gene *nifA* como observado em *S. meliloti* (Anthamatten & Hennecke, 1990; 1991). Os autores observaram que em *B. japonicum* o operon *fixRnifA* é expresso mesmo em condições aeróbicas e que em condições microaeróbicas a expressão deste operon é dependente do produto NifA e incrementada em 5 vezes. Esta expressão constitutiva é derivada da atividade de um promotor, cuja seqüência sobrepõe a de um promotor do tipo σ^{54} resultando em sítios de iniciação separados por apenas 2 pares de bases, dependente de um fator sigma denominado σ^{96} (Barrios et al., 1995). Apesar de ser expressa constitutivamente a proteína NifA não é capaz de ativar a transcrição dos outros genes *nif* em aerobiose provavelmente por não estar em sua conformação ativa devido ao efeito direto do oxigênio ou devido a ação de um modulador negativo. Tem sido postulado que o processo de inativação da proteína NifA dependente de oxigênio pode estar relacionado com a estrutura do tipo C-X₁₁-C-X₁₉-C-X₄-C presente na proteína NifA de *B. japonicum* e diazotrofos de diversos grupos, exceto nas codificadas pelos genes *nifA* de *A. vinelandii*, *E. agglomerans* e *K. pneumoniae* (Merrick, 1992, 1993). Esta estrutura, segundo Fischer et al. (1987, 1988) parece funcionar como sítio para ligação de metal e

foi observado que, em presença de agentes quelantes, houve inativação “in vivo” da proteína NifA de *B. japonicum*. Os resultados sugeriram que possivelmente a atividade da proteína NifA é dependente da associação de um metal na sua forma reduzida e que provavelmente a sensibilidade da proteína NifA ao oxigênio pode estar relacionada com a oxidação deste centro metálico.

Outro tipo de regulação da expressão do gene *nifA* foi identificado em *Azorhizobium caulinodans*, diazotrofo simbiótico encontrado em nódulos de *Sesbania* spp. que apresenta como característica única entre os diazotrofos do grupo dos rizóbios altas taxas de fixação tanto em simbiose quanto em vida livre (Dreyfus et al., 1983; Ratet et al., 1989). Em *A. caulinodans* o processo de transcrição do gene *nifA* é mediado pelos produtos dos genes *fixLJ* e *fixK* como em *S. meliloti* (Kaminski & Elmerich, 1991; Kaminski et al., 1991). Entretanto, em *A. caulinodans* o produto do gene *fixK* desempenha papel de ativador da transcrição do gene *nifA*, ao contrário do observado em *S. meliloti* (Kaminski et al., 1991). O envolvimento do produto do gene *ntrC* na regulação do gene *nifA* neste microrganismo foi evidenciado pelo estudo de mutantes *ntrC*. Apesar de mutantes *ntrC* de *A. caulinodans* apresentarem diminuição na capacidade de fixar N₂ em cultura e formarem nódulos mais lentamente, estes nódulos fixam N₂ em níveis semelhantes aos do selvagem (Pawłowski et al., 1987). Além disso, dois novos genes reguladores (*ntrY* e *ntrX*) isolados em *A. caulinodans* codificam para um terceiro grupo de sensor-regulador que de alguma forma modula a expressão de genes *nif* neste diazotrofo (Pawłowski et al., 1991). Estudos ao nível da seqüência de bases do gene *nifA* de *A. caulinodans* revelaram a presença de três elementos em *cis* na região promotora deste gene, os quais possivelmente funcionam como sítio para ligação das proteínas FixK, NifA e de um promotor do tipo σ^{54} (Stigter et al., 1993; Loroch et al., 1995). Para avaliação do envolvimento desses elementos em *cis* na expressão do gene *nifA*, em relação ao oxigênio e fontes de nitrogênio, foram construídas estirpes carregando alterações nestes elementos tanto no selvagem quanto em mutantes *fixK*, *fixJ*, *nifA*, *ntrC* e *rpoF*. A Avaliação da expressão de fusões *nifA-uidA* indicaram que em *A. caulinodans* este gene está sujeito a regulação dependente de dois tipos de promotores, um do tipo σ^{70} regulado positivamente pela proteína FixK e outro do tipo σ^{54} dependente do produto do gene *ntrC* e a própria proteína NifA exerce papel de regulador negativo da sua expressão

(Loroch et al., 1995). Além disso, os autores observaram que a relação entre a atividade desses dois promotores em *A. caulinodans* é interdependente, ao contrário da atividade independente normalmente observada em outras bactérias inclusive no operon *fixRnifA* de *B. japonicum*. Com base nos resultados obtidos, em *A. caulinodans* a proteína NifA, em presença de altas concentrações de amônia ou oxigênio, deve funcionar como repressor da sua expressão ligando-se ao “NifA box” e impedindo a ativação dos promotores pelas proteínas FixK ou NtrC.

1.2 - Regulação da FBN em *Azospirillum brasilense*

Desde o início da década de 80 o estudo do mecanismo de regulação da transcrição dos genes *nif* em *Azospirillum brasilense* tem atraído a atenção de diversos grupos. Pedrosa & Yates (1984) obtiveram através de mutagenização com nitrosoguanidina duas classes de mutantes regulatórios de *A. brasilense*. O mutante FP10 apresenta o fenótipo Nif e só foi complementado pelo plasmídeo pCK3 (*K. pneumoniae nifA^c*), posteriormente Liang et al. (1991) confirmou que o genótipo do mutante apresenta mutação no gene *nifA*. Os mutantes FP8 e FP9, caracterizados pelo fenótipo Nif e incapacidade de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio, foram complementados por plasmídeos recombinantes contendo os genes *nifA^C* (expresso constitutivamente, pCK3) ou *glnAntrBC* de *K. pneumoniae* (pGE10). A observação de que plasmídeo pGE50, contendo uma inserção do transposon Tn5 no gene *ntrC*, não complementou os mutantes FP8 e FP9 sugeriu que os mutantes eram do tipo *ntrC*. Estes fatos levaram os autores a postularem que o mecanismo de regulação em *Azospirillum* era semelhante ao observado em *K. pneumoniae*.

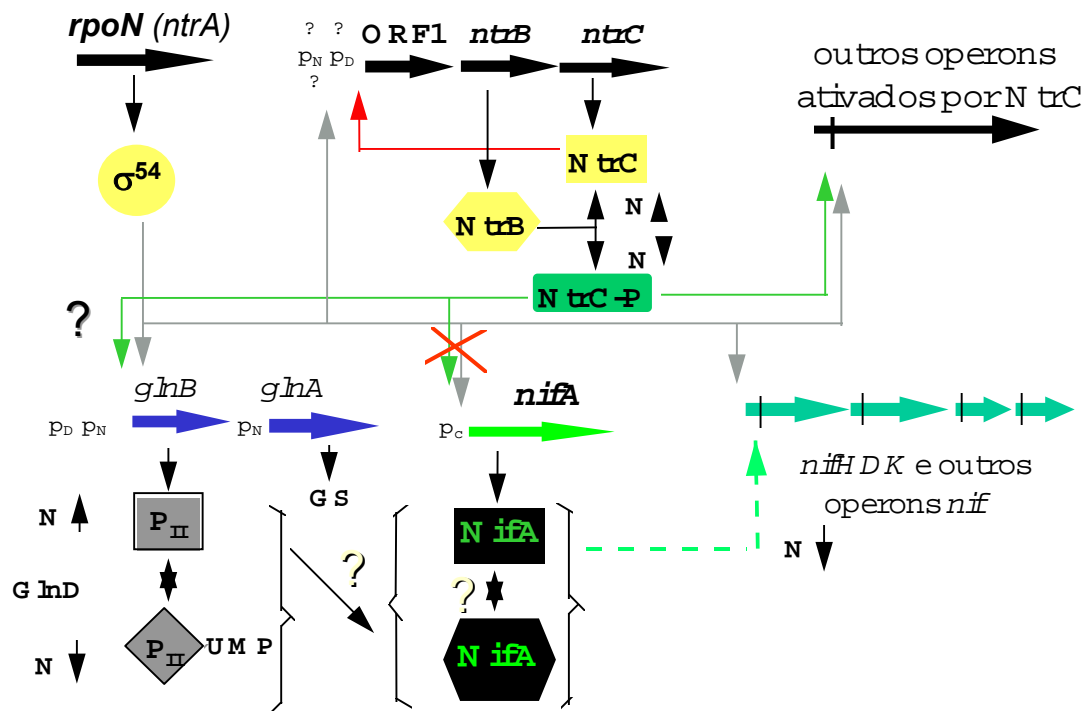
Gauthier & Elmerich (1977) haviam isolado dois mutantes derivados de *A. brasilense* (7028 e 7029), auxotrofos para glutamina e caracterizados por mutação associada a região contendo o gene *glnA*, que no entanto apresentavam fenótipos Nif contrastantes: o mutante 7028 foi caracterizado como Nif constitutivo e o 7029 como Nif. Entretanto, o envolvimento de outros genes no mecanismo de regulação em *Azospirillum* só foi evidenciado por Fogher et al. (1985) através da complementação do mutante *A. brasilense* 7029 (Nif e auxotrofo para glutamina) com o plasmídeo pAB441.

A análise estrutural da região do DNA de *A. brasilense* contido no pAB441 indicou a presença do gene *glnA* e revelou que neste diazotrofo o operon *ntrBC* não está localizado próximo do gene *glnA* (Bouzoklian & Elmerich, 1986; Bouzoklian et al., 1986). A presença do gene *glnB*, codificador para a proteína P_{II}, localizado a 5' do gene *glnA* em *Azospirillum* foi observado por de Zamaroczi et al. (1990). Estes autores também observaram dois produtos de transcrição contendo o gene *glnA*, cujos tamanhos corresponderam a 1,5 kb e 2,4 Kb, sugerindo que o gene *glnA* pode ser transcrito pelo seu próprio promotor ou cotranscrito junto com o *glnB* de acordo com o nível de N-celular. Estudos posteriores com fusões *glnB-lacZ* e *glnA-lacZ* confirmaram que a cotranscrição do operon *glnBA* e transcrição do gene *glnA* é inversamente regulada de acordo com o nível de N-celular (de Zamaroczi et al., 1993). Além disso, a transcrição do gene *glnB* é mediada independentemente por dois promotores: p1 - dependente do fator σ^{70} e p2 - dependente do fator σ^{54} , sequencialmente organizados a 5' do início da transcrição do gene. Observou-se que sob condições de fixação de nitrogênio, a transcrição do gene *glnA* a partir do seu promotor foi quase completamente abolida, o que não ocorreu na presença de amônia ou glutamato (de Zamaroczi et al., 1993). A inativação do gene *glnB* pela inserção de um cassete, contendo o gene para resistência a canamicina, resultou em um mutante de *A. brasilense* (estirpe 7606) prototrofo com fenótipo Nif⁻ (Liang et al., 1992 ab). Estudos de expressão de fusões *lacZ* com os genes *nifA*, *nifH* e *nifB* no mutante *glnB*⁻ revelaram que a expressão do gene *nifA* não foi afetada ao passo que não foram observadas expressão do gene da β -galactosidase quando as fusões eram associadas aos genes *nifH* ou *nifB*. O mesmo tipo de comportamento foi observado no mutante 7029 (Nif⁻, *glnA*⁻), por outro lado, no caso do mutante 7028 (Nif^C) a expressão das fusões *lacZ* com os genes *nifA*, *nifH* e *nifB* foi observada na ausência e na presença de amônia (Liang et al., 1992a) sugerindo o mutante pode apresentar defeito no transporte de amônia. Os resultados indicaram aos autores que apesar de estar sendo expressa nos mutantes *glnB*⁻ (7606) e *glnA*⁻ (7029), a proteína NifA deve se encontrar inativa e portanto incapaz de ativar a transcrição de outros genes *nif* sob condições de fixação de nitrogênio. Estes fatos têm sugerido aos autores que os produtos dos genes *glnA* e *glnB* estão envolvidos no processo de regulação em *A. brasilense*. A proteína P_{II}, produto do gene *glnB*, pode estar direta ou indiretamente relacionada com o processo de

modulação pós-traducional da atividade da proteína NifA sob condições limitantes de N, entretanto o envolvimento da GS (*glnA*) neste processo ainda precisa ser esclarecido (Figura 3). Recentemente, outro gene codificador para uma proteína denominada Pz (produto do gene *glnZ*), estruturalmente semelhante porém funcionalmente distinta da proteína P_{II} (codificada pelo gene *glnB*), foi identificado em *A. brasilense* (de Zamaroczy et al., 1996). Este fato pode explicar o fenótipo distinto do mutante *glnB* de *A. brasilense* em relação ao obtido em outros microrganismos. Além disso, os autores sugerem, com base no alto grau de similaridade com a proteína P_{II} de *E. coli*, que o produto do gene *glnZ* (P_z) pode estar envolvido com o processo de regulação pós-traducional da atividade de proteínas como NtrB-NtrC e/ou GS.

O isolamento e sequenciamento do gene *nifA* (Knopik et al., 1990; Liang et al., 1991) revelou que em *A. brasilense* este gene não apresenta promotor com seqüência consenso semelhante ao observado para promotores dependente do fator σ^N , nem sítios para ligação da proteína NtrC ou da própria NifA (Liang et al., 1991). A transcrição e expressão da fusão *nifA-lacZ* foi observada em condições de fixação de nitrogênio e mesmo na presença de amônia e oxigênio (Liang et al., 1992 ab; Liang et al., 1993; de Zamaroczy et al., 1993).

Figura 3 - Mecanismo de Regulação em *A. brasilense*.



Recentemente, Arsène et al. (1996) propuseram um modelo para a ativação da proteína NifA de *A. brasilense*. Estes autores observaram que o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* é responsável pela estabilização da forma inativa dessa proteína na presença de amônia, e sugerem que o produto do gene *glnB* está envolvido direta ou indiretamente na alteração conformacional necessária para ativação desta proteína reguladora. Além disso, em *A. brasilense* a restauração do fenótipo Nif⁺ parece estar diretamente relacionada com o papel da proteína NtrC na regulação da expressão da proteína P_{II} (moduladora da atividade da proteína NifA) e/ou na regulação da atividade da nitrogenase (switch-off) dependente de amônia (Liang et al., 1993; de Zamaroczi et al., 1993; Machado et al., 1995).

1.3 - Regulação da FBN em *Herbaspirillum seropedicae*

Os genes *nifA* e o operon *glnAntrBC* de *H. seropedicae* foram isolados através de complementação de mutantes *nifA*⁻ de *A. brasilense* e *ntrC*⁻ de *E. coli*. A capacidade de

plasmídeos recombinantes contendo os genes *nifA* e o operon *glnAntrBC*, isolados a partir de *H. seropedicae*, em restaurar o fenótipo Nif⁺ em mutantes regulatórios de *A. brasilense* sugeriu o envolvimento desses genes na regulação da transcrição de genes *nif* em *H. seropedicae* (Souza, 1990; Souza et al., 1991; Teixeira, 1991). A presença de sequências consenso para promotores do tipo -24/-12 (σ^N dependentes) e sítios de ligação para as proteínas NifA e NtrC a 5' do gene *nifA* de *H. seropedicae* levou Souza et al. (1991) a sugerir que em *H. seropedicae* a regulação da transcrição do gene *nifA* era mediado pela ação de RpoN, NifA e NtrC e, portanto semelhante ao descrito para *K. pneumoniae*. Posteriormente, a análise da região promotora através de “footprinting” mostrou que o promotor do gene *nifA* é ativo tanto em *E. coli* quanto em *H. seropedicae*, na ausência de amônia (Pedrosa et al., 1994). Além disso, o fenótipo Nif⁻ em mutante no gene *glnB* sugere que a atividade da proteína NifA é regulada na presença de amônia pela proteína P_{II} (Benelli et al., 1997). Estudos da expressão de fusões *nifA-lacZ* em mutantes *nifA*⁻ de *H. seropedicae* e na estirpe selvagem revelaram, que apesar de não ter sido afetada por concentrações atmosféricas de O₂, a expressão foi inibida (80%) na presença de 20 mM de NH₄Cl em ambos. Segundo os autores, estes resultados sugeriram que a proteína NifA de *H. seropedicae* não atua como ativador da sua própria transcrição. Por outro lado, deleções da região promotora demonstraram que a integridade do sítio de ligação para proteína NtrC é essencial para a ativação da expressão do gene *nifA*, neste microrganismo (Pedrosa et al., 1994). Além disso, outras deleções da região promotora que levaram a eliminação dos sítios para NtrC e IHF (Integration Host factor – responsável pela formação de curvatura na molécula de DNA favorecendo o contato entre a proteína NifA e o fator σ^N – ver Robertson & Nash, 1988; Santero et al., 1989) restauraram a atividade do promotor do gene *nifA* em *H. seropedicae* sob condições de fixação de N₂, sendo observado repressão da sua expressão por NH₄⁺ e O₂. Entretanto, no mutante *nifA*⁻ de *H. seropedicae* não ocorreu expressão da fusão *nifA-lacZ* sugerindo que, na ausência dos sítios para ligação de NtrC e IHF, a proteína NifA pode funcionar como auto-ativador da sua expressão (Pedrosa et al., 1997).

Estas observações revelaram que em *H. seropedicae* a proteína NtrC é o potencial regulador positivo da transcrição do gene *nifA* em resposta à limitação de nitrogênio, ao contrário do observado no caso de mutantes *ntrC*⁻ de *A. brasilense* (Pedrosa et al., 1994).

dependente de regulação positiva pela proteína NtrC (Teixeira, 1997a). Além disso, o sequenciamento das região codificadora e vizinhas ao gene *nifA* permitiu identificar os diferentes domínios do produto deduzido da sequência de nucleotídeos. A proteína NifA de *A. diazotrophicus* apresenta na região central e C-terminal regiões bastante conservadas em outras proteínas NifA, tais como sítio potencial para ligação de nucleosídeos trifosfatados (NTPs) e estrutura terciária do tipo hélice-volta-hélice, respectivamente. Outra importante característica da proteína NifA desse microrganismo é a presença de 4 resíduos de cisteína na sua estrutura primária, sendo dois deles separados por 4 resíduos de outros aminoácidos (CXXXXC). Esta estrutura identificada em diversas outras proteínas NifA, exceto em *K. pneumoniae*, *A. vinelandii*, *A. chroococum* e *E. agglomerans* (subdivisão γ das proteobactérias) tem sido associada a sensibilidade desse grupo de proteínas ao oxigênio. Estudos preliminares têm revelado que a expressão da fusão *nifA-gus* é regulada principalmente por oxigênio e, portanto, reforça o papel de uma região com alta homologia ao sítio anaerobox (Nees et al., 1988) observada a 5' do início da região codificadora para o gene *nifA* (Meletzus et al., 1997; Teixeira et al., 1997).

Outros genes reguladores do tipo *ntrB*, *ntrC*, *ntrX* e *ntrY* assim como *glnB* e *glnD* também foram isolados por complementação e por reação de amplificação em cadeia (PCR –m Polymerase chain Reaction) na presença de “primers” derivado de regiões conservadas dos gene *gln* e *ntr* de outros organismos (Meletzus et al., 1997; Perlova et al., 1997). O papel desses genes na regulação da expressão e atividade da proteína NifA de *A. diazotrophicus* em resposta a amônia está em fase de estudos utilizando fusões *nifA-gus* em mutantes específicos.

2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHAMATTEN, D.; HENNECKE, H. Identification and functional analysis of *fixLJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum*. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation: Achievements and objectives**. New York: Chapman, 1990. p.508.

- ANTHAMATTEN, D.; HENNECKE, H. The regulatory status of the *fixL* and *fixJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 225, p.38-48, 1991.
- ARSÉNE, F.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Nodulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: Evidence for a Regulatory Role of the NifA N-terminal Domain. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p.4830-4838, 1996.
- BARRIOS, H.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H.; MORETT, E. Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum nifA* expression. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.156, p.251-256, 1995.
- BATUT, J.; TERZAGHI, B.; GHÉRARDI, M.; HUGUET, M.; TERZAGHI, E.; GARNERONE, A.M.; BOISTARD, P.; HUGUET, T. Localization of a symbiotic *fix* region on *Rhizobium meliloti* pSym megaplasmid more than 200 kilobases from the *nod-nif* region. **Molecular and General Genetics**, New York, v.199, p.232-239, 1985..
- BATUT, J.; DAVERON-MINGOT, M.; DAVID, M.; JACOBS, J.; GARNERONE, A.M.; KAHN, D. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli* regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. **EMBO Journal**, Oxford, v.8, p.1279-1286, 1989.
- BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.179, p.4623-4626, 1997.
- BLANCO, G.; DRUMOND, M.H.; WOODLEY, P.R.; KENNEDY, C. Sequence and molecular analysis of the *nifL* gene of *Azotobacter vinelandii*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.9, p.869-879, 1993.
- BOUZOKLIAN, H.; ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. **Biochimie**, Paris, v.68, p.1181-1187, 1986.

- BOUZOKLIAN, H.; FOGHER, C.; ELMERICH, C. Cloning and characterization of the *glnA* gene of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Annales de L'Institut Pasteur. Série Microbiooogie**, Paris, v.137B, p.3-10, 1986.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V.; CANNON, M.C.; BEYNON, J.; CANNON, F.C. Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, v.294, p.776-778, 1981.
- DAVID, M.; DAVERAN, M-L.; BATUT, J.; DEDIEU, A.; DOMERGUE, O.; GHAI, J.; HERTIG, C.; BOISTARD, P.; KAHN, D. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. **Cell**, Cambridge, v.54, p.671-683, 1988.
- DE BRUIJN, F.J.; HILGERT, U.; STIGTER, J.; SCHNEIDER, M.; MEYER, Z.A.H.; KLOSSE, U.; PAWLOWSKI, K. Regulation of nitrogen fixation and assimilation genes in the free-living versus symbiotic state. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation: Achievements and objectives**. New York: Chapman, 1990. p.33-44.
- DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, n.4, p.715-733, 1994.
- DE PHILIP, P.; BATUT, J.; BOISTARD, P. *Rhizobium meliloti* FixL is an oxygen sensor and regulates *Rhizobium meliloti nifA* and *fixK* genes differently in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p.4255-4262, 1990.
- DE ZAMAROCZI, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* of *Azospirillum brasilense*. **Molecular and General Genetics**, New York, v.224, p.421-430, 1990.

- DE ZAMAROCZI, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, p.2507-2515, 1993.
- DE ZAMAROCZI, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different P_{II} proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p.4143-4149, 1996.
- DIXON, R.; KENNEDY, C. ; KONDOROSI, A. ; KRISHNAPILLAI, V.; MERRICK, M. Complementation Analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. **Molecular and General Genetics**, New York, v.157, p.189-198, 1977.
- DIXON, R.A.; AUSTIN, S.; BUCK, M.; DRUMMOND, M.; HILL, S.; HOLTEL, A.; MACFARLANE, S.; MERRICK, M.; MINCHIN, S. Genetics and regulation of *nif* and related genes in *Klebsiella pneumoniae*. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, Série B, v.317, p.147, 1987.
- DREYFUS, B.L.; ELMERICH, C.; DOMMERGUES, Y.R. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.45, p.711-713, 1983.
- ESPIN, G.; ALVAREZ-MORALES, A.; CANNON, F.; DIXON, R.; MERRICK, M. Cloning of the *glnA*, *ntxB* e *ntxC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. **Molecular and General Genetics**, New York, v.186, p.518-24, 1982.
- FISCHER, H.-M.; HENNECKE, H. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. **Molecular and General Genetics**, New York, v.209, p.621-626, 1987.

- FISCHER, H.-M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Research**, London, v.16, p.2207-2224, 1988.
- FOGHER, C.; BOUZOKLIAN, H.; BANDHARI, S.K.; ELMERICH, C. Construction of a genomic library of *Azospirillum brasilense* Sp7 and cloning of the glutamine synthetase gene. In: KLINGMULLER, W., ed . **Azospirillum III: genetics, physiology and ecology**. Berlin: Springer Verlag, 1985. p.30-40.
- GAUTHIER, D.; ELMERICH, C. Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in *Spirillum lipoferum*. **FEMS Microbiology Letters**, London, v2, p.101-104, 1977.
- GILES-GONZALES, M.A.; DITTA, G.S.; HELSINKI, D.R. A Haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. **Nature**, London, v.350, p.170-172, 1991.
- GUSSIN, G.N.; RONSON, C.W.; AUSUBEL, F.M. Regulation of nitrogen fixation genes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.20, p.567-591, 1986.
- HERTIG, C.; LY, R.Y.; LOUARN, A-M.; GARNERONE, A-M.; DAVID, M.; BATUT, J.; KAHN, D.; BOISTARD, P. *Rhizobium meliloti* regulatory gene *fixJ* activates transcription of *R.meliloti nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.1736-1738, 1989.
- KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Involvement of *fixLJ* in the regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, p.665-673, 1991.
- KAMINSKI, P.A.; MANDON, K.; ARIGONI, F.; DESNOUES, N.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: Identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, p.1983-1991, 1991.

- KENNEDY, C. Linkage map of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular and General Genetics**, New York, v.157, p.199-204, 1977.
- KNOPIK, M.A.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; SOUZA E.M.; MACHADO, H.B.; PEDROSA, F.O. Cloning of the *nifA* and *nifB* genes of *Azospirillum brasilense* strain FP2. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M., ed. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.133-138. (Developments in Plant and Soil Science, v.48).
- LIANG, Y.Y.; ARSÉNE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Molecular and General Genetics**, New York, v.240, p.188-196, 1993.
- LIANG, Y.Y.; DE ZAMAROCZI, M.; ARSÉNE, F.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiology Letters**, London, v.79, p.113-119. 1992a.
- LIANG, Y.Y.; DE ZAMAROCZI, M.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Regulation of *nif* gene expression in *Azospirillum brasilense*. **Symbiosis**, Rehovot, v.13, p.307-315, 1992b.
- 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. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, p.2735-2774, 1991.
- LOROCH, A.L.; NGUYEN, B.G.; LUDWIG, R.A. Interactive regulation of *Azorhizobium nifA* transcription via overlapping promoters. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.7210-7221, 1995.

- MACHADO, H.B.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3-like-ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.674-684, 1995.
- MERRICK, M.J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman, 1992. p.835-876.
- MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., ed.. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1993. p. 43-54.
- MORGAN, T.V.; McCRAKEN, J.; ORME-JOHNSON, W.H.; MIMS, W.B.; MORTENSON, L.E.; PEISACH, J. Pulsed electron paramagnetic resonance studies of the interaction of MgATP and D₂O with the iron protein of nitrogenase. **Biochemistry**, Washington, v.29, p.3077-3082, 1990.
- NEES, D.W.; STEIN, P.A.; LUDWIG, R.A. The *Azorhizobium caulinodans nifA* gene: Identification of upstream-activating sequences including a new element, the anaerobox. **Nucleic Acids Research**, London, v.16, p.9839-9853, 1988.
- NOONAN, B.; MOTHERWAY, M.; O'GARA, F. Ammonia regulation of the *Rhizobium meliloti* nitrogenase structural and regulatory genes under free-living conditions: Involvement of the fixL gene product? **Molecular and General Genetics**, New York, v.234, p.423-428, 1992.
- PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; DE BRUIJN, F.J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Molecular and General Genetics**, New York, v.231:124-138, 1991.

- PAWLOWSKI, K.; RATET, P.; SCHELL, J.; DE BRUIJN, F.J. Cloning and characterization of *nifA* and *ntrC* genes of the stem nodulating bacterium ORS571, the nitrogen fixing symbiont of *Sesbania rostrata*. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes in the free-living versus symbiotic state. **Molecular and General Genetics**, New York, v.206, p.207-219, 1987.
- PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, London, v.23, p.95-101, 1984.
- PEDROSA, F.O.; MACHADO, H.B.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; STEFFENS, M.B.; MACHADO, I.P.; RIGO, L.U. Organização e regulação dos genes da fixação biológica de nitrogênio em *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3., REUNIÃO DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E BRADHYRIHIZOBIUM, 6., 1994, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 1994. p. 13-33.
- PEDROSA, F.O.; MACHADO, I.M.P.; STEFFENS, M.B.R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E.M.; MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation in *Herbaspirillum seropedicae*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 11., 1997, Paris. **Abstracts...** Paris: Institut Pasteur/INRA/CNRS/CEA/ORSTOM/CIRAD, 1997. p.29.
- PEDROSA, F.O.; TEIXEIRA, K.R.S.; MACHADO, I.M.P.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; ISHIDA, M.L.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v .29, p.843-846, 1997.
- RAINA, R.; BAGESHWAR, U.K.; DAS, H.K. The *Azotobacter vinelandii nifL*-like gene nucleotide sequence analysis and regulation of expression. **Molecular and General Genetics**, New York, v .237, p.400-406, 1993.

- RATET, P.; PAWLOWSKI, K.; SCHELL, J.; DE BRUIJN, F.J. The *Azorhizobium caulinodans* nitrogen-fixation regulatory gene *nifA*, is controlled by the cellular nitrogen and oxygen status. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.3, p.825-838, 1989.
- REIS, V.M. **Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de nitrogênio *Acetobacter diazotrophicus***. Itaguaí: UFRRJ, 1991. 119p. Tese de Mestrado.
- ROBERTSON, C.A.; NASH, H.A. Bending of the Bacteriophage/attachment site by *Escherichia coli* integration host factor. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.263, p.3554-3667, 1988.
- SANTERO, E.; HOOVER, T.; KEENER, J.; KUSTU, S. *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.86, p.7346-7350, 1989.
- SEVILLA, M.; MELETZUS, D.; TEIXEIRA, K.; LEE, S.; MUTAKKI, A.; BALDANI, J.I.; KENNEDY, C. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.871-874, 1997.
- SOUZA, E.M. **Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba: UFPR, 1990. Tese de Doutorado.
- SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.137, p.1511-1522, 1991.
- STIGTER, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J. *Azorhizobium caulinodans* nitrogen fixation (*nif/fix*) gene regulation: mutagenesis of the *nifA* -24/-12 promoter element, characterization of a *ntrA* (*rpoN*) gene, and derivation of a model. **Molecular Plant-microbe Interactions**, St. Paul, v.6, p.238-252, 1993.
- STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.7, p.1-23, 1988.

- SZETO, W.W.; NIXON, B.T.; RONSON, C.W.; AUSUBEL, F.M. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.1423-1432., 1987.
- TAYLOR, M.; BUTLER, R.; CHAMBERS, S.; CASIMIRO, M.; BADI, F.; MERRICK, M. The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor σ^N plays a role in promoter recognition. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.22, p.1045-1054, 1996.
- TEIXEIRA, K.R. dos S. **Isolamento e caracterização do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae* Z78**. Curitiba: UFPR, 1991. Tese de Mestrado.
- TEIXEIRA, K.R. dos S. ***Acetobacter diazotrophicus*, endófito diazotrófico associado à cana-de-açúcar: presença de plasmídeos e sequenciamento do gene *nifA*, responsável pela regulação da fixação biológica de nitrogênio**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ – Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 1997a. 168p. Tese de Doutorado
- TEIXEIRA, K.R. dos S. **Bases moleculares e genética da Fixação de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997b. 26p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32)
- TEIXEIRA, K.R.S.; GALLER, R.; BALDANI, J.I. Identificação de plasmídeos em diferentes estirpes de *Acetobacter diazotrophicus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.64, p.429, 1992.
- WALMSLEY, J.; TOUKDARIAN, A.; KENNEDY, C. The role of regulatory genes *nifA*, *vnfA*, *anfA*, *nfrX*, *ntrC* and *rpoN* in expression of genes encoding the three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.162, p.422-429, 1994.
- ZHANG, Y.; BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P. Cloning, sequencing, mutagenesis and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.3364-3369, 1992.