



THIAGO ESTEFANO RODRIGUES

**OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES His-AmtB E COMPLEXO His-DraT-GlnB DE
Azospirillum brasilense.**

CURITIBA

2011

THIAGO ESTEFANO RODRIGUES

**OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES His-AmtB E COMPLEXO His-DraT-GlnB DE
Azospirillum brasilense.**

Monografia apresentado ao curso de graduação
em Ciências Biológicas pela Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof Dr. Luciano Fernandes Huergo.
Co-orientadora: Dra. Luíza Maria de Araújo

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Luciano Fernandes Huergo pela excelente orientação, pelo exemplo de competência profissional e pela pessoa admirável que é. Considero-me uma pessoa de muita sorte por ter, um dia, escolhido esse professor como orientador, sem saber o quão certa foi minha escolha. O aprendizado que obtive sob tal orientação é de inestimável valor.

Agradeço também ao professor Dr. Silvio Marquez Zanata, pelo exemplo de humanidade e pelos ensinamentos os quais carregarei sempre comigo. Sou muito grato às pessoas do seu laboratório (Laboratório de Neurobiologia) por pacientemente me ensinarem a dar os primeiros passos no mundo científico. Agradeço em especial a Dra. Elizabeth Cunha Penna de Moraes, a Dra. Michele Dietrich Moura Costa e ao Msc. Luiz Eduardo Rizzo de Souza, por além do aprendizado, também pelo carinho, pelo exemplo e pela motivação.

Sou muito grato aos amigos da turma de biologia 2008 noturno, por contribuírem indiretamente para este trabalho. Em especial agradeço a Tássia Landim Fritoli por me ajudar em momentos difíceis, ao Giovanni Bruno Pascoeto pela amizade verdadeira e ao Marcos Tarcisio de Carvalho por ter se mostrado ultimamente um grande amigo a ser preservado por toda a vida.

Agradeço ao meu amigo Dr. Rosalvo Olavo pelos conselhos que me permitiram atingir meus objetivos. Ao meu amigo de infância, Bruno Gomes Carvalho, a quem devo minha gratidão por todos esses anos de amizade.

Agradeço às pessoas das salas 271 e 272 do departamento de Bioquímica pela amizade e pela ajuda na realização deste trabalho. A agradabilidade do dia a dia agradeço especialmente à Patrícia Sotomaior, à Edileusa C. M. Gerhardt e à Dra. Luíza M. de Araújo que também contribuiu grandemente para elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio pela oportunidade, auxílio técnico e suporte financeiro. Ao CNPq pela bolsa que foi essencial para a conclusão do curso de graduação em Ciências Biológicas. Sou grato à coordenação do curso de Ciências Biológicas pela orientação e dedicação e a Universidade Federal do Paraná pela qualidade da formação a mim possibilitada.

A minha família devo eterna gratidão, especialmente a minha amada madrinha Carolina Rodrigues Carvalho pelo carinho e zelo. Agradeço a minha mãe Maria Helena Rodrigues pelo exemplo e pelo amor que enche a minha vida de força e determinação. E agradeço a DEUS por estar sempre comigo.

LISTA DE ABREVIATURAS

Amt	=	Transportador de amônia
ADP	=	5' difosfato de adenosina
ATP	=	5' trifosfato de adenosina
D.O	=	densidade óptica
DraG	=	dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	=	dinitrogenase ADP-ribosil transferase
EDTA	=	ácido etilenodiamino-tetra ético
GlnB-UMP	=	proteína GlnB uridililada
GlnZ-UMP	=	proteína GlnZ uridililada
IPTG	=	β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
LDAO	=	n-dodecil-N-N-dimetilamina-N-oxide
MEP	=	metilamônio permease
rpm	=	rotação por minuto
SDS	=	dodecilsulfato de sódio
tris	=	Tris(hidroximetil)-aminometano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Purificação de His-AmtB.....	17
Figura 2 – Pureza de His-AmtB.....	18
Figura 3 – Western blot.....	18
Figura 4 – Atividade de His-AmtB.....	18
Figura 5 – Purificação do complexo His-DraT-GlnB em coluna de níquel.....	20
Figura 6 – Purificação do complexo His-DraT-GlnB em coluna de heparina – sistema AKTA.....	21
Figura 7 – Purificação do complexo His-DraT-GlnB em coluna de heparina – bomba peristáltica.....	22
Figura 8 – Teste de expressão – <i>E. coli</i> BL21 pDK7glnB/pLHPETdraT.....	23
Figura 9 – Teste de indução – <i>E. coli</i> BL21 pLHDK7glnB/pLHPETdraT.....	23
Figura 10 – Purificação do complexo His-DraT-GlnB – <i>E. coli</i> BL21 pLMA4(GlnB)/pLHPETdraT.....	24
Figura 11 - Purificação do complexo His-DraT-GlnB – <i>E. coli</i> BL21 pAbBT Duet (His-DraT e GlnB).....	25
Figura 12 – Co-purificação das proteínas His-DraT e GlnB.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	1
1.2 Proteína AmtB.....	2
1.3 Proteínas da família PII.....	3
1.4 Proteínas DraT e DraG.....	4
2 JUSTIFICATIVA.....	7
3 OBJETIVOS.....	8
3.1 Objetivos gerais.....	8
3.2 Objetivos específicos.....	8
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
4.1 Meios de cultura e condições de cultivo.....	9
4.1.1 Cultivo de células para purificação de His-AmtB.....	9
4.1.2 Cultivo de células para purificação do complexo His-DraT-GlnB.....	9
4.2 Antibióticos.....	10
4.3 Plasmídeos.....	10
4.4 Purificação de plasmídeos.....	10
4.5 Transformação bacteriana.....	11
4.5.1 Transformação por choque térmico.....	11
4.5.1.1 Preparo das células.....	11
4.5.1.2 Choque térmico.....	11
4.6 Purificação de proteínas.....	12
4.6.1 Purificação de His-AmtB.....	12
4.6.2 Purificação do complexo His-DraT-GlnB.....	12
4.7 Eletroforese de DNA.....	13
4.8 Eletroforese de proteínas.....	13
4.9 Pull Down.....	14
4.10 Western blot.....	14
4.11 Dosagem de proteínas.....	15
5 RESULTADOS.....	16
5.1 Otimização da expressão e purificação da proteína recombinante His-AmtB de <i>Azospirillum brasilense</i>	16
5.2 Otimização da expressão e purificação do complexo protéico recombinante His-DraT-GlnB de <i>Azospirillum brasilense</i>	19
6 DISCUSSÃO.....	27

6.1 Otimização da expressão e purificação da proteína recombinante His-AmtB de <i>Azospirillum brasilense</i>	27
6.2 Otimização da expressão e purificação do complexo protéico recombinante His-DraT-GlnB de <i>Azospirillum brasilense</i>	28
7 CONCLUSÃO.....	31
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

RESUMO

Em *Azospirillum brasilense*, o metabolismo do nitrogênio tem a proteína integral de membrana AmtB como molécula chave na absorção e percepção dos níveis de amônia do ambiente extracelular. Essa proteína é membro da família Amt/MEP/Rh de proteínas transportadoras de amônia, encontradas em arquea, eubactérias, fungos, plantas e animais. Em *A. brasilense*, a limitação de amônia seguida de disponibilidade repentina no meio extracelular leva a proteína AmtB a formar um complexo com as proteínas da família PII (GlnB e GlnZ). As proteínas PII são encontradas em quase todos os procariotos e plantas, são homotriméricas e participam na percepção de carbono, nitrogênio e energia. Em altos níveis de glutamina intracelular, cada monômero de PII pode ser uridililado de maneira reversível. Quando as proteínas PII estão em seu estado desuridililado, a formação do complexo Amt-PII é favorecida. A formação deste complexo também responde aos níveis de ATP/ADP e 2-oxoglutarato, sendo estabilizado por ADP. A regulação da atividade da nitrogenase, enzima responsável pela fixação biológica do nitrogênio, é auxiliada pelo sistema DraT e DraG. A enzima DraG ativa a nitrogenase removendo ADP-ribosil da subunidade NifH e DraT inativa a nitrogenase adicionando ADP-ribosil a NifH. As proteínas PII estão envolvidas na regulação das enzimas DraG e DraT. Em resposta a um choque de amônio, a proteína GlnZ interage com DraG possibilitando o carregamento de DraG para a membrana formando um complexo ternário AmtB-GlnZ-DraG que resulta na inativação de DraG. Concomitantemente, GlnB desuridililada interage com DraT, ativando a ADP-ribosilação da nitrogenase.

As proteínas AmtB, DraT e GlnB vêm sendo purificadas e estudadas *in vitro*, no entanto, existem muitos eventos a serem melhor compreendidos no processo de fixação biológica de nitrogênio. No presente trabalho foi realizada, em sistema procarioto de purificação, a otimização da expressão e purificação da proteína His-AmtB de *Azospirillum brasilense*. Também se trabalhou com o intuito de se obter ótima expressão do complexo His-DraT-GlnB para purificação em condições que possibilitem, futuramente, a sua cristalização.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Azospirillum brasilense*

Azospirillum brasilense é uma bactéria Gram negativa pertencente à classe α das Proteobactérias que utiliza como fonte de nitrogênio o próprio nitrogênio atmosférico, dita, portanto diazotrófica. O gênero *Azospirillum* tem atualmente 16 espécies descritas e tem sido frequentemente isolado de amostras de solos agrícolas, associado às raízes de diversas plantas (BASHAN, HOLGUIN e BASHAN, 2004). Esse gênero é capaz de incorporar o elemento nitrogênio sob a forma de dinitrogênio atmosférico, glutamato, glutamina, íons amônio (NH_4^+), íons nitrato (NO_3^-) e íons nitrito (NO_2^-) (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). *Azospirillum brasilense* em meio líquido apresenta um flagelo polar e em superfície sólida apresenta um flagelo polar e vários laterais (CARREÑO-LÓPEZ et al., 2009).

Atualmente, inoculantes comerciais de linhagens de *Azospirillum* estão sendo testadas. Foi mostrado que quando certas linhagens de *Azospirillum* foram inoculadas em sementes, estas bactérias promoveram o crescimento vegetal de gramíneas, girassol, arroz, tomateiro, tabaco, abacaxi, banana entre outros vegetais de interesse econômico (HARTMANN e BALDANI, 2006). Recentemente foi demonstrado por Mariangela Hungria e colaboradores (2010) que a inoculação de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* às sementes do trigo e do milho proporciona aumento em média do rendimento (em Kg/ha) de 27% e 31% respectivamente, em relação às plantas não inoculadas. Esse estudo resultou nas primeiras linhagens de *Azospirillum* a serem autorizadas para a produção de inoculante comercial no Brasil. Na América Latina, inoculantes de *Azospirillum* estão sendo aplicados a centenas de milhares de hectares de cultivares de trigo, milho, sorgo e arroz (FIBACH-PALDI, BURDMAN e OKON, 2011). Embora a fixação de nitrogênio de *Azospirillum* seja muito importante para a promoção do crescimento vegetal, a produção e secreção de agentes promotores do crescimento, como fitormônios, tais como auxinas, giberelinas e citocininas, além de óxido nítrico, são provavelmente componentes chave para a sinalização do crescimento vegetal (FIBACH-PALDI, BURDMAN e OKON, 2011).

1.2 Proteína AmtB

As proteínas da família Amt/MEP/Rh são encontradas em arquea, protistas, plantas, fungos, invertebrados e até vertebrados, e atuam como transportadoras de amônio através da membrana plasmática (TREMBLAY e HALLENBECK, 2009). Essas proteínas são homotrímeros que possuem um poro e 11 hélices transmembrana por subunidade que atuam como canal passivo para a condução de amônia e não amônio através da membrana. A forma transportada (amônio ou amônia) ainda está em discussão, mas devido aos dados atuais sugere-se a mudança na denominação da família de “transportadora de amônio” para “transportadora de amônia” (WINKLER e STROUD, 2006). A estrutura cristalográfica da proteína AmtB suporta a aparente ligação do amônio no vestibulo periplasmático de AmtB e sua desprotonação para amônia por auxílio dos anéis imidazólicos de 2 histidinas no canal de AmtB, assim, penetrando na célula após reprotonação a amônio. (KHADEMI et al., 2004; KHADEMI e STROUD, 2006; ZHENG et al., 2004).

Diferentemente de *Escherichia coli*, em *A. brasilense* o gene *amtB* não é co-transcrito com o gene de proteínas do tipo PII, proteínas chave no processo de fixação do nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998). Esse gene, quando deletado, leva à perda da capacidade da célula de transportar metilamônio e a redução do crescimento em meio contendo baixos níveis de nitrogênio (VAN DOMMELEN et al., 1998).

Em *E. coli*, a absorção de amônia parece estar relacionada ao acoplamento das atividades de uma enzima chamada glutamina sintetase (GS) e de AmtB (JAVELLE et al., 2005). GS é um dodecâmero composto por dois arranjos hexagonais sobrepostos que converte glutamato em glutamina pela adição de amônia (LEIGH e DODSWORTH, 2007). O processo de absorção de amônia, é regulado pela interação da proteína AmtB com as proteínas PII (GlnB e GlnZ) na membrana, isso ocorre quando células de *A. brasilense* são submetidas a choque de amônio com adição de 200µM NH₄Cl (HUERGO et al., 2006a).

As proteínas da família Amt de todos os domínios da vida vêm sendo purificadas e estudadas a nível estrutural. A proteína AmtB da bactéria *Escherichia coli* (KHADEMI et al., 2004; ZHENG et al., 2004), Amt-1 da arquea *Archaeoglobus fulgidus* (ANDRADE et al., 2005) e proteínas da sub-família Rh, a Rh50 da bactéria *Nitrosomonas europaea* e a RhCG de humanos (GRUSWITZ et al., 2010; LUPO,

2007) possuem suas estruturas cristalográficas resolvidas. A proteína AmtB de *E. coli* foi pela primeira vez purificada por Blakey et al., (2002). Nesse trabalho, foi possível verificar que AmtB é muito estável na presença do agente redutor β -mercaptaetanol e sob a ação desnaturante de SDS, fato que gera um padrão de bandas em eletroforese SDS-PAGE característico, apresentando bandas correspondentes às formas monoméricas, diméricas, triméricas e até em altos oligômeros de AmtB e variando de experimento para outro quanto as formas presentes no SDS-PAGE. Formas em altos oligômeros das proteínas MEP em *Saccharomyces cerevisiae* (os transportadores de amônia de leveduras são conhecidos como MEP) são sugeridas por Marini et al., (2000). A purificação da proteína AmtB de *E. coli* vem sendo realizada a partir do fracionamento de membrana em linhagens de *E. coli* C43 para expressão com vetores controlados pelo promotor T7 (ZHENG et al., 2004; GRUSWITZ, CONNEL e STROUD, 2007). Os trabalhos que descrevem a purificação das proteínas da família Amt/MEP/Rh não descrevem o rendimento da purificação. A proteína AmtB de *A. brasilense* apresentou um rendimento muito baixo, cerca de 100 μ g por litro de cultura (HUERGO et al., 2007). Neste trabalho buscou-se no melhoramento do protocolo de purificação de His-AmtB de *Azospirillum brasilense* para facilitar seu estudo *in vitro*.

1.3 Proteínas da família PII

Representantes dessa família são encontrados em todo o domínio bactéria, em arquea e nos cloroplasto de eucariotos fototróficos, como algas vermelhas e plantas (FORCHHAMMER, 2008).

Proteínas do tipo PII são transdutoras de sinais amplamente distribuídas e conservadas que atuam de acordo com os níveis intracelulares de nitrogênio, carbono e energia regulando a atividade de outras proteínas alvo por meio de interação proteína-proteína. As proteínas dessa família são triméricas e cada monômero possui uma região muito flexível chamada volta-T, muito importante em interações com outras proteínas (LEIGH e DODSWORTH, 2007; FORCHHAMMER, 2008). Cada trímero de PII pode se ligar competitivamente a três moléculas de ADP ou ATP (JIANG e NINFA, 2007) e ainda pode ligar-se também a três moléculas de 2-oxoglutarato (TRUAN et al., 2010; FOKINA et al., 2010).

Em *Azospirillum brasilense*, as proteínas PII, GlnB e GlnZ, apresentam 112

resíduos de aminoácidos e 82.1% de similaridade (DE ZAMAROCZY et al., 1996). Essas proteínas, como citado anteriormente, são sequestradas para a membrana quando submetidas a choque de amônio, interagindo com AmtB sob tal orientação que permite o fechamento do canal de amônio pela volta T de cada trímero de PII (GRUSWITZ, CONNEL e STROUD, 2007), sendo esse complexo estabilizado por ADP e desestabilizado por ATP e 2-oxoglutarato (DURAND e MERRICK, 2006; HUERGO et al., 2007; RADCHENKO, THORNTON, e MERRICK, 2010). Para que as PII possam interagir com AmtB, é necessário que elas estejam desuridililadas. O estado de uridililação das proteínas PII é regulado pela enzima GlnD que é capaz de adicionar e remover o grupamento uridilil em um resíduo conservado de tirosina (Tyr51) de acordo com nível de glutamina intracelular, sendo que cada trímero pode receber até 3 grupamentos UMP. Sob choque de amônio, glutamina intracelular é alta e as PII são desuridililadas por GlnD, (ARAUJO et al., 2008; JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998)

1.4 Proteínas DraT e DraG

A ADP-ribosilação é uma forma de regulação pós-traducional catalisada por enzimas com atividade mono ou poli(ADP)-ribosil-transferases. Tais enzimas utilizam NAD^+ como fonte de ADP-ribose para ligar este grupo covalentemente à proteína alvo. A reversão desta atividade pode ocorrer pela ação de enzimas ADP- ribosil-hidrolases (ARHs) ou poli(ADP)-ribosil- hidrolases (PARGs) (LIN, 2007).

A fixação biológica do nitrogênio é catalisada pela enzima nitrogenase, a forma mais comum desta enzima é constituída pelas proteínas NifH (dinitrogenase redutase) e NifDK (dinitrogenase). Em α -proteobactérias, tais como *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* e *Azospirillum brasilense*, a nitrogenase é reversivelmente inativada em resposta à presença de amônio e redução de energia (ZHANG et al., 1993; ZHANG et al., 1997). A inativação desta enzima ocorre pela atividade da enzima DraT (dinitrogenase ADP-ribosil transferase) que catalisa a adição de forma covalente de um grupo ADP-ribose ao resíduo Arg101 da sub-unidade NifH da nitrogenase. Quando a célula encontra-se sob condições de fixação de nitrogênio, a atividade da nitrogenase é retomada pela hidrólise do grupamento ADP-ribose, processo catalisado pela enzima DraG (dinitrogenase ADP-ribosil redutase glicohidrolase) (LEIGH e DODSWORTH, 2007). Em *A. brasilense*, essa

atividade de DraG é dependente de íon divalente como Mg^{2+} , Mn^{2+} e Fe^{2+} (LJUNGSTROM, YATES e NORDLUND, 1989; LI et al., 2009).

Foi demonstrado *in vivo* que, em *A. brasilense*, a proteína GlnB não modificada interage diretamente com DraT e que ambas as formas de GlnZ interagem diretamente com DraG (HUERGO et al., 2006b). A regulação de DraT e DraG pelas proteínas PII ocorre de acordo com nível intracelular de ADP, ATP, 2-OG, glutamina e amônio. Quando os níveis intracelulares de ADP, glutamina e amônio extracelular são baixos e os níveis de ATP e 2-OG intracelulares são altos, as proteínas PII estão uridililadas, assim, GlnB-UMP não é capaz de ligar-se à DraT e deste modo não ocorre a adição de grupamento ADP-ribose à NifH, possibilitando atividade da enzima nitrogenase pela remoção de tal grupamento pela DraG. Se tais concentrações de ADP, ATP, 2-OG, glutamina e amônio estiverem invertidas então as PII são desuridililadas, DraG é carregada à membrana formando complexo ternário AmtB-GlnZ-DraG inativando a enzima DraG e GlnB interage com DraT que torna-se então capaz de ADP-ribosilar NifH, assim, inativando a nitrogenase (HUERGO et al., 2006a; HUERGO et al., 2007; HUERGO et al., 2009).

Em *A. brasilense* sabe-se que DraT interage com GlnB *in vivo*, quando essa interação ocorre, em resposta a choque de amônio, DraT é ativada (HUERGO et al., 2006a). A enzima DraT também é capaz de interagir com GlnB em *R. rubrum* (ZHU et al., 2006) e em *R. capsulatus* (PAWLOWSKI et al., 2003) com demonstrado em sistema duplo híbrido. A formação do complexo DraT-GlnB também foi verificada *in vitro*, e essa interação, em *Azospirillum brasilense*, parece ser desestabilizada por 2-OG quando na presença de ATP ou AMP, mas na ausência de 2-OG (2-oxoglutarato) todas as formas de adeninas nucleotídeo favorecem a formação do complexo. Esse favorecimento evidencia a forte influência efetora de ADP, pois além de favorecer a formação desse complexo, ADP também inibe a ação de 2-OG na desestabilização de His-DraT-GlnB. Essa regulação alostérica sugere que *in vivo* esse complexo pode responder aos níveis de energia (HUERGO et al., 2009).

As proteínas da família PII possuem protocolos de purificação bem caracterizados em Proteobactéria (ARAÚJO et al., 2008; HUERGO et al., 2005; KAMBEROV et al, 1994; MOURE et al., 2011), com rendimento de 27% do extrato total de proteínas (MOURE et al., 2011) e sua estrutura 3D já é conhecida em vários organismos (LEIGH e DODSWORTH, 2007; FORCHHAMMER, 2008). No entanto, a estrutura 3D de DraT ainda não é conhecida e, para que se possa resolver tal

estrutura, a purificação de DraT é de grande importância. A purificação de DraT de *R. rubrum* foi demonstrada por Lowery (1988) em coluna de celulose na presença de ADP, com NaCl como eluente e expressão sob controle do promotor de *nifH*, em linhagem hospedeira de *R. rubrum*. O rendimento foi de 0,002% do conteúdo solúvel de proteínas, depois disso, algumas modificações nesse método foram feitas (LOWERY e LUDDEN, 1989; GRUNWALD et al., 1995; GRUNWALD e LUDDEN, 1997), mas de maneira geral, DraT foi purificada com rendimento muito baixo e com alguma perda de atividade de DraT purificada. Em *A. brasilense*, His-DraT foi purificada em coluna de níquel (HUERGO et al., 2005) apresentando-se predominantemente insolúvel, contudo, notou-se que essa proteína pode ser co-purificada com GlnB na presença de ADP, com um significativo aumento da solubilidade de His-DraT (cerca de 30%). Esse complexo foi co-purificado sob a razão estequiométrica de 1:1 (monômero de DraT:trímero de GlnB), tais proteínas apresentaram intensidade de bandas em gel de eletroforese muito semelhante, proporção que está de acordo com as massas moleculares do monômero de His-DraT (37,342 KDa) e do trímero de GlnB (37,113 KDa) (HUERGO et al., 2009).

Este trabalho buscou otimizar a expressão e a purificação do complexo His-DraT-GlnB, para que, em um momento futuro, seja possível realizar ensaios de cristalografia e, assim, determinar a estrutura dessa interação. A importância de se determinar a estrutura 3D de DraT deve-se ao fato de que esta ainda não é conhecida e o entendimento dos mecanismos da regulação da atividade de DraT e DraG em resposta aos sinais ambientais não é completamente compreendido. A determinação da estrutura 3D de DraT-GlnB permitiria uma melhor caracterização dos eventos conformacionais desse complexo, assim como da regulação pós-traducional da nitrogenase pelo sistema de ADP-ribosilação, possibilitando também comparações mecânicas com outros organismos. Além disso, as proteínas PII, vêm sendo caracterizadas por interagir com alvos de arquitetura similar, ou seja, alvos triméricos, estrutura que parece ser chave para o entendimento das funções regulatórias de PII (FORCHHAMMER, 2008). No entanto, a interação de DraT com GlnB não segue esse modelo, pois tal complexo ocorre sob a estequiometria de 1 monômero (DraT) para 1 trímero (GlnB) (HUERGO et al., 2009). Por isso, análises funcionais e estruturais são importantes para elucidar os princípios da interação física entre PII e DraT.

2 JUSTIFICATIVA

Este trabalho visou a otimização da expressão e purificação da proteína recombinante His-AmtB de *Azospirillum brasilense*. A otimização deste protocolo irá facilitar a análise *in vitro* da proteína AmtB de *A. brasilense*. Além disso, o protocolo desenvolvido pode ser potencialmente implementado na purificação de proteínas AmtB de outros organismos facilitando ensaios *in vitro* com proteínas da família Amt. Visou-se também a otimização da expressão e purificação do complexo recombinante His-DraT-GlnB de *Azospirillum brasilense*. A otimização deste protocolo visa, futuramente, a cristalização deste complexo a fim de resolver sua estrutura 3D. A determinação da estrutura do complexo DraT-GlnB é fundamental para o entendimento dos mecanismos estruturais e funcionais envolvidos na regulação mediada pela proteína GlnB.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Otimização da expressão e purificação da proteína recombinante His-AmtB.

- Otimização da expressão e purificação do complexo recombinante His-DraT-GlnB de *Azospirillum brasilense*.

-

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer a linhagem celular e o meio de cultivo ideal capaz de melhor super-expressar His-AmtB e o complexo His-DraT-GlnB. Testando a expressão das proteínas codificadas nos plasmídeos, descritos no item 4.3, em células *E. coli* GT1000 (para His-AmtB) e (para His-DraT-GlnB) termo-competentes ou eletrocompetentes

- Determinar o melhor método cromatográfico para purificação do complexo His-DraT-GlnB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A solução de cloreto de amônio foi autoclavada separadamente e adicionada ao meio de cultura LB (SAMBROOK, et al., 1989) no momento de uso. O pH do meio LB foi ajustado para 6,8. O meio M9-glutamina foi feito no momento do uso pela adição das soluções componentes à água milliQ previamente autoclavada. As soluções constituintes de M9-glutamina foram esterilizadas separadamente por autoclavagem, exceto a de glutamina que foi filtrada (membrana filtrante 0,22 μ m – Millipore). A solução de glutamina foi feita somente logo antes de ser preparado o meio, para evitar sua conversão a NH_3^+ . O meio M9-glutamina (20% de solução 1 (45mM Na_2HPO_4 , 17mM KH_2PO_4 , 40mM NaCl), 1,6M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200mM glucose, 10 μ M CaCl_2 e 1,3mM glutamina) foi feito da seguinte forma: Em 620mL de água milliQ autoclavada em um erlenmeyer de 2L, adicionou-se 160mL de solução 1 (27,2g Na_2HPO_4 , 12g KH_2PO_4 e 2g NaCl para 800mL de solução 1), 1,6mL de MgSO_4 1M, 16mL de glucose 20%, 80 μ L de CaCl_2 1M e 8mL de glutamina 20mg/mL).

4.1.1 Cultivo de células para purificação de His-AmtB

Algumas colônias de células *E. coli* GT1000 ($\Delta\text{glnKamtB}$) (COUTTS et al., 2002) transformadas com plasmídeo pLHDK7HisAmtB foram crescidas em 16mL de meio LB com cloranfenicol 30 μ g/mL sob agitação de 200rpm a 37°C por cerca de 16 horas. Depois disso todo esse volume foi adicionado a 800mL de meio M9-glutamina com respectivo antibiótico. Para o consumo dos nutrientes do meio LB do inóculo, deixou-se 2h sob as mesmas condições de agitação e temperatura. Em seguida foi adicionado 0,5mM de IPTG para a indução por 16h.

4.1.2 Cultivo de células para purificação do complexo His-DraT-GlnB

Algumas colônias de células BL21 transformadas com pLHPETDraT e pLHDK5PII foram crescidas em 20mL de meio LB com canamicina 100 μ g/mL e ampicilina 500 μ g/mL sob agitação de 200rpm a 37°C por 16h. Depois disso, todo esse volume foi adicionado a 400mL de meio LB com os respectivos antibióticos (Km 50 μ g/mL e Amp 250 μ g/mL) suplementado com 20mM de NH_4Cl (MACHADO et al.,

1991). O cultivo foi procedido a 37°C sob agitação de 120rpm até ser atingida a DO₆₀₀=0,5. Então foi adicionado 0,5mM de IPTG para indução a 30°C sob agitação de 200rpm por 5 horas.

4.2 Antibióticos

Os antibióticos utilizados, ampicilina (Amp), cloranfenicol (Cm) e canamicina (Km), foram preparados conforme SAMBROOK (1989) e os estoques mantidos a 4°C, exceto ampicilina (Amp), conservada a -20°C.

As soluções de antibióticos foram preparadas em água MilliQ autoclavada, e esterilizadas por filtração em filtro Millipore HAWP 0,22m, exceto Cm que é diluído em álcool 96%.

4.3 Plasmídeos

Plasmídeo	Promotor	Expressão	Resistência	Referência
pLHDK7HisAmtB	<i>ptac</i>	His-AmtB (<i>A.b</i>)	Cloranfenicol	Huergo, 2007
pLHPETdraT	T7	His-DraT (<i>A.b</i>)	Canamicina	Huergo, 2005
pLHDK5PII	<i>ptac</i>	GlnB (<i>A.b</i>)	Ampicilina	Huergo, 2005
pDK7glnB	<i>ptac</i>	GlnB (<i>A.b</i>)	Ampicilina	Araújo, 2008
pLMA-4	T7	GlnB (<i>A.b</i>)	Ampicilina	Araújo, 2004
pAbBTDuet	T7	His-DraT e GlnB (<i>A.b</i>)	Ampicilina	Cedido por M. A. S. de Oliveira

4.4 Purificação de plasmídeos

A extração de plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK, FRITSCH E MANIATIS,1989), em que uma cultura de células, após ter sido incubada durante a noite em meio LB, foi centrifugada a 13.000 rpm por 60 segundos. O sedimento foi ressuspendido em tampão GET (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8,0 e 10mM de EDTA pH 8,0) e a lise celular foi efetuada com a adição de 1% SDS e 0,2M NaOH. O DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com 3M acetato de potássio pH 4,8. Após incubação por 10 minutos em banho de gelo foram adicionados 100µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a amostra então foi agitada em agitador de tubos sendo em seguida centrifugada. A fase aquosa foi coletada e a ela adicionada 2 volumes de etanol 96% com a finalidade de

precipitar o DNA plasmidial. Após isso a mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 80%. Finalmente o precipitado foi seco a vácuo, de um dia para o outro na bancada ou por 3h no fluxo laminar e depois foi ressuspensão em água. Alternativamente, o DNA plasmidial pode ter sido purificado usando kit de purificação de plasmídeos.

4.5 Transformação bacteriana

As células de *E. coli* foram utilizadas para super expressar as proteínas de interesse e a transformação foi realizada por choque térmico.

4.5.1 Transformação bacteriana por choque térmico

4.5.1.1 Preparo das células

Algumas colônias de *E. coli* crescidas em meio LA foram inoculadas em 5mL de meio LB na presença de antibióticos, a cultura foi incubada sob agitação por cerca de 16 horas a 37°C. Todo o pré-inóculo transferido para um frasco de 1L contendo 250mL de LB mais antibióticos e a cultura foi incubada a 37°C até atingir densidade $D.O_{600}$ entre 0,3 e 0,4. As células foram deixadas no gelo por 30 minutos, centrifugadas a 3.000g por 10 minutos a 4°C, sendo então ressuspensas em 30mL de uma solução gelada de $CaCl_2$ 0,1M. Após 30 a 60 minutos no gelo as células foram coletadas por centrifugação (sob as mesmas condições), ressuspensas em 8mL de solução gelada de $CaCl_2$ 0,1M + 15% de glicerol. Frações de 200 μ L foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

4.5.1.2 Choque térmico

As alíquotas de células foram retiradas do freezer -80°C e mantidas no gelo por 30 minutos. 50ng de plasmídeo purificado foi misturado com as células, mantendo-se no gelo por 30 minutos, seguido de banho a 42°C por 2 minutos. As células foram então imediatamente transferidas para o banho de gelo, suspensas em 1mL de LB, e recuperadas a 37°C por 40 minutos, alíquotadas e plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados.

4.6 Purificação proteínas

Proteínas fusionadas com uma sequência de 6 histidinas (His-Proteína) foram purificadas por cromatografia de afinidade em uma coluna Hi-Trap-Chelating-Ni²⁺ (GE Healthcare) carregada com NiCl₂ como descrito pelo fabricante e acoplada a uma bomba peristáltica. O extrato de proteína livre de células foi obtido por centrifugação do cultivo a 3400g a 4°C, ressuspensão das células em tampão de sonicação (conforme proteína a ser purificada) e sonicação no gelo em sonicador MSE Soniprep 150 usando amplitude de aproximadamente 10 µm por 15 vezes de 15s com intervalos de 15s e centrifugação do lisado a 30000g a 4°C.

4.6.1 Purificação de His-AmtB

A partir de 800mL de cultivo celular (item 4.1.1) foi feito o extrato de proteína livre de células (item 4.6) em 15mL de tampão de sonicação gelado (50mM tris HCl pH8, 1% LDAO, 10% de glicerol, 100mM NaCl). A proteína AmtB fusionada com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal (His-AmtB) foi purificada em coluna de níquel carregada com NiCl₂. Essa coluna foi lavada com 10mL de água MilliQ autoclavada, equilibrada com 5mL de tampão de sonicação gelado, submetida ao extrato de proteínas totais e então aos tampões de eluição (50mM tris HCl pH8, 0,05% LDAO, 10% de glicerol, 100mM NaCl, e imidazol - 10, 50, 300 ou 500mM) em ordem crescente de concentração de imidazol. Alíquotas de 1mL foram coletadas em tubos de 1,5mL e então analisadas em SDS-PAGE. As alíquotas referentes à proteína His-AmtB foram dialisadas a 4°C com 150mL de tampão de diálise (50mM tris-HCl pH8, 100mM NaCl, 50% glicerol, 0,05% LDAO) durante à noite e por 2h. Então as frações foram mantidas a -20°C.

4.6.2 Purificação do complexo His-DraT-GlnB

A partir de volume de cultivo celular de 400mL foi feito o extrato de proteína livre de células (item 4.1.2) em 20mL de tampão de sonicação gelado (100mM de tris HCl pH8, 100mM de NaCl, 10% de glicerol, 1mM de MgCl₂ e 0,5mM de ADP –

adicionado somente no momento do uso). As proteínas foram co-purificadas usando coluna de níquel que foi carregada com NiCl_2 , lavada com 10mL de água milliQ autoclavada, equilibrada com 5mL de tampão de sonicação, submetida ao extrato de proteínas totais e então a 5mL de cada um dos tampões de eluição (100mM de tris HCl pH8, 100mM de NaCl, 10% de glicerol, 1mM de MgCl_2 e 0,5mM de ADP – adicionado somente no momento do uso – e imidazol -10, 50, 100, 300 ou 500mM) adicionados a coluna em ordem crescente de concentração de imidazol.

Nas purificações em coluna de heparina (HiTrap™ Heparin HP Columns - GE-Healthcare), a coluna foi submetida ao tampão A (50mM de Tris HCl pH8 e 100mM de NaCl) e depois ao tampão B (50mM de Tris HCl pH8 e 1M de NaCl) para eluição em sistema AKTA - GE Healthcare – de purificação. As purificações em coluna de heparina com bomba peristáltica foram feitas submetendo a coluna a 10mL de água milliQ autoclavada, 5 mL de tampão de sonicação, depois ao extrato de proteínas totais, 10mL de tampão A, 5mL de tampão A com 15% de B, 5mL de tampão A com 35% de B e por último a 5mL de tampão B. Alíquotas de 1mL foram coletadas em tubos de 1,5mL e analisadas em SDS-PAGE. As alíquotas referentes ao complexo His-DraT-GlnB foram dialisadas a 4°C com 150mL de tampão de diálise (20mM tris-HCl pH8, 100mM NaCl, 1mM MgCl_2 , 10% glicerol, 0,05% LDAO e 0,5mM ADP – adicionado no momento do uso) durante à noite e por 2h. Então as frações foram mantidas a -20°C.

4.7 Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989) com modificações. O DNA foi visualizado, após tratamento com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em transluminador de luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

4.8 Eletroforese de proteínas

Eletroforeses de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas em gel de poliacrilamida (12,5%) como descrito por Laemmli et al., (1970). A concentração do gel de corrida foi utilizada conforme a massa molecular

da proteína a ser analisada. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad). As corridas foram realizadas a voltagem constante de 100-180V em tampão de corrida 1X (30g de tris-base, 140g de glicina e 10g de SDS por litro de tampão 10X) pelo tempo necessário de acordo com as amostras a serem analisadas. Após a corrida o gel pôde ser corado com Coomassie Blue, prata ou SYPRO® ruby INVITROGEN conforme indicações dos fabricantes ou transferido para membranas (Western blot) dependendo do ensaio.

4.9 Pull Down

Os ensaios de interação entre as proteínas His-AmtB e PII foram realizados usando resina magnética de níquel (His Mag™ Agarose-Beads-Invitrogen), as quais foram lavadas com tampão de lavagem (50mM de tris HCl pH8, 100mM NaCl, 10% de glicerol, 0,05% LDAO, 10mM Imidazol, 5mM de MgCl₂, 3,2mM ADP) no qual as proteínas foram adicionadas e incubadas por 30 minutos no gelo vortexando levemente a cada 10 minutos. Após lavagem com tampão de lavagem foi feita a eluição com tampão contendo 5mM de ATP e 5mM de α -cetoglutarato.

4.10 Western blot

Após a realização de eletroforese SDS-PAGE, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de PVDF (Hybond ECL – GE Healthcare) utilizando um sistema de transferência semi-seco, no qual a placa do ânodo foi inicialmente coberta com 4 camadas de papel filtro previamente imersas em tampão A1 (0,3M tris-HCl pH 10, 20% metanol). Duas camadas de papel filtro contendo tampão A2 foram colocadas no sistema, seguido da membrana de PVDF previamente imersa no tampão A2 (25mM tris-HCl pH 10, 20% metanol). O gel foi então colocado sobre a membrana sempre se tomando o devido cuidado para evitar bolhas de ar no sistema. 6 camadas de papel filtro contendo tampão C (25mM tris-HCl pH 10, 40mM ácido caprótico, 20% metanol) foram colocadas sobre o gel. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro e então o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80mA por 1 hora. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% em TBST por 1 hora a temperatura ambiente, lavada com TBST (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L) e

incubada com o anticorpo primário (anti-His monoclonal - GE-Healthcare) em leite 5% TBST sob a diluição de 1/2000, sendo mantida a 4°C durante a noite sob agitação. Depois disso, a membrana foi lavada por 15 minutos com TBST, seguido de 3 lavagens de 5 minutos cada. A membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase - GE Healthcare) na diluição de 1/5000 a temperatura ambiente por 1 hora. Após 6 etapas de lavagens com TBST (1X de 15 minutos e 5X de 5 minutos), a membrana foi submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais foram capturados em filmes de raio-X (BioMax–GE Healthcare).

4.11 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Otimização da expressão e purificação da proteína recombinante His-AmtB de *Azospirillum brasilense*

Para uma melhor eficiência na purificação da proteína AmtB de *A. brasilense*, foi utilizado o vetor pDK7 sob controle do promotor *ptac* e sob indução com IPTG para expressar AmtB fusionada a calda de 6 histidinas na sua porção N-terminal (HUERGO et al., 2007). Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, a proteína AmtB de *A. brasilense* foi purificada a partir da expressão sob controle do promotor T7 (vetor pET28a) em células *E. coli* C43 cultivadas em meio rico LB suplementado com NH₄Cl, para evitar a formação de heterotrímeros entre monômeros de AmtB de *E. coli* e de *A. brasilense* (GRUSWITZ et al., 2010; MARINI et al., 2000). Para purificação de dessa proteína, foi utilizada uma etapa de fracionamento de membrana, comumente utilizada para proteínas de membrana, com rendimento obtido abaixo de 100µg de proteína por litro de cultura (HUERGO, 2007). Neste trabalho se fez o uso de células *E. coli* GT1000 (Δ *glnKamtB*) (COUTTS et al., 2002). Essa linhagem foi escolhida pelo fato de ela não expressar GlnK e AmtB endógenas, evitando a titulação de PII pela expressão de AmtB exógena. Uma vez que se sabe que ocorre interação entre AmtB de *E. coli* e PII de *A. brasilense* (RODRIGUES et al., 2011), possivelmente o inverso também ocorra, consequentemente gerando problemas de reprodutividade da expressão de His-AmtB, como encontrado em Huergo et al (2007). A titulação de PII provavelmente acarrete em depleção de outros sistemas regulados pelas PII de *E. coli*, como o sistema Ntr, sendo , portanto, a expressão de AmtB exógena tóxica para as células (BLAUWKAMP e NINFA, 2003). Essa toxicidade, ocasionada pela expressão de AmtB, possivelmente seleciona células cuja expressão de AmtB ocorre a uma dose não letal, proporcionando baixa expressão de His-AmtB de *A. brasilense* e de maneira não reprodutível. O meio escolhido para o cultivo de *E. coli* GT1000 foi o meio M9-glutamina, pois esse meio propicia uma maior e mais reprodutiva expressão do que verificado quando utilizado meio rico LB para a proteína AmtB de *E. coli* (Dr. Mike Merrick, comunicação pessoal). Em meio M9-glutamina, as proteínas GlnB da *E. coli* hospedeira encontram-se uridililadas, pois glutamina no meio acarreta em condição limitante de nitrogênio para a célula (ATKINSON e

NINFA, 1998), assim, não permitindo a titulação de PII pela AmtB super expressa.

Esta forma de expressão gerou um rendimento de cerca de 900µg de proteína por litro de cultura com reprodutividade de expressão. A etapa de fracionamento de membrana foi removida, a purificação foi realizada com uma única etapa cromatográfica em coluna de Ni²⁺ de 1mL (figura 1). Um detalhe relevante, foi a retirada da etapa de eluição com 100mM de imidazol, pois nessa concentração ocorreu o desprendimento de His-AmtB em algumas frações em concentrações muito baixas o que resulta em perda de rendimento final (dados não mostrados). Partindo-se, portanto, direto para eluição com 300mM de imidazol após as lavagens com 10 e 50mM, a eluição permitiu a captura de praticamente toda a His-AmtB retida na coluna em uma única fração em alta concentração, como mostrado na linha 3 da figura 1.

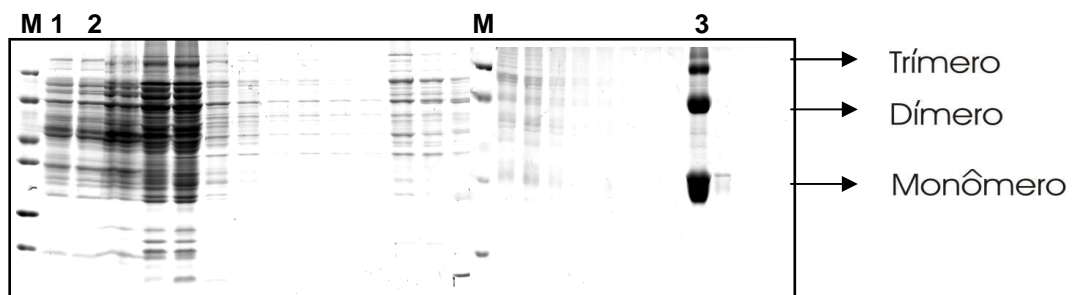


FIGURA 1. Purificação de His-AmtB. Extrato total de células *E. coli* GT1000 portando pLHDK7HisAmtB aplicado à coluna de Ni²⁺. Eluição com gradientes de imidazol. M - marcador de massa molecular em kDa (116, 66, 45, 35, 25, e 18). Linha 1 - Extrato celular total, Linha 2 - Extrato pós-coluna de Ni²⁺. Linha 3 - HisAmtB eluída em 300mM de imidazol. Demais linhas - frações crescentes de imidazol da esquerda para a direita. SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

Foi realizada diluição seriada de His-AmtB purificada para verificar em eletroforese SDS-PAGE o grau de contaminação obtido na única etapa cromatográfica usada para a purificação de His-AmtB de *A. brasilense*. O gel de eletroforese foi submetido à análise com software Lab Works (UVP) para avaliar a pureza de His-AmtB que se apresentou 86% pura (figura 2). A His-AmtB obtida foi submetida a Western blot (figura 3), com anticorpo monoclonal anti-His (GE Healthcare). O ensaio de Western blot foi feito a partir de diluição seriada da His-AmtB purificada, para confirmar pela análise do padrão de bandamento apresentado se há bandas inespecíficas e se o padrão de bandas corresponde ao padrão típico de His-AmtB de *A. brasilense*. Na figura 3, é possível verificar bandas

referentes a monômeros e trímeros de His-AmtB, confirmando que a proteína purificada foi uma proteína com calda His e que o padrão de migração eletroforética SDS-PAGE corresponde ao comumente visto para His-AmtB. Em Blakey et al., 2002, verificou-se que a AmtB de *E.coli* é muito estável frente a ação redutora e desnaturante de β -mercaptaetanol e SDS respectivamente, e apresenta certa variação quanto as formas oligoméricas em eletroforese SDS-PAGE.

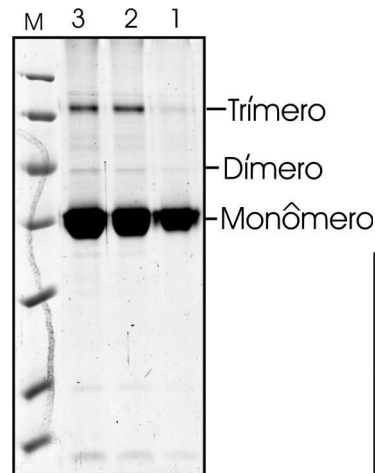


FIGURA 2. Pureza de His-AmtB. – Proteína His-AmtB purificada e dialisada. M - marcador de massa molecular em kDa (116, 66, 45, 35, 25, 18 e 14). Linha 3: 3µg de proteínas; Linha 2: 2µg de proteínas; Linha 1: 1µg de proteínas. SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

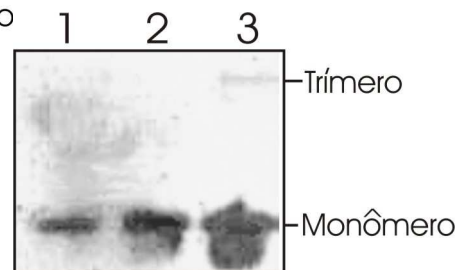


FIGURA 3. Western blot – Diluição seriada de His-AmtB purificada da direita para a esquerda; Linha 1: 0,3µg de proteína; Linha 2: 0,95µg de proteína; Linha 3: 2,25µg de proteína. Anticorpo monoclonal anti His (GE₃Healthcare).

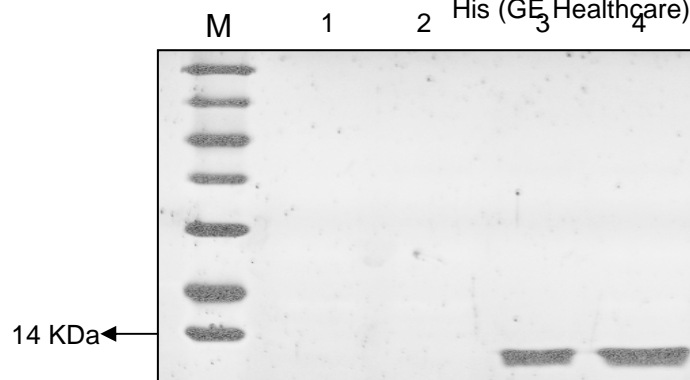


FIGURA 4. Atividade de His-AmtB. Ensaio de Pull Down para demonstrar interação entre HisAmtB com as proteínas GlnB e GlnZ. Foi utilizado 20µg de HisAmtB e 40µg de GlnB e GlnZ. M - marcador de massa molecular em kDa (116, 66, 45, 35, 25, 18 e 14); 1- Resina, sem proteínas, submetida aos mesmos procedimentos das demais amostras (mesmos tampões); 2- His-AmtB; 3- HisAmtB e GlnB; 4- HisAmtB e GlnZ. Eluição com tampão 5mM de ATP e 5mM de α -cetogluturato SDS-PAGE corado com SYPRO® ruby INVITROGEN.

Para melhor corroborar a identidade da proteína purificada e também avaliar seu estado conformacional foi realizado um ensaio de pull-down (item 4.9) para analisar sua atividade, averiguando a já conhecida capacidade de interação de AmtB

com as proteínas PII em *A. brasilense* (HUERGO et al., 2006a). O ensaio de pull-down foi realizado usando uma resina magnética de níquel (INVITROGEN), que foi lavada, equilibrada com ADP e submetida à incubação com as proteínas His-AmtB e as proteínas PII (GlnB ou GlnZ para cada tubo) sob a presença de ADP. A desestabilização desses complexos foram feitas pela adição de tampão com ATP e 2-OG, permitindo que somente GlnB ou GlnZ fosse eluída e verificada em eletroforese SDS-PAGE, como mostra a figura 4. Esse resultado confirma a purificação e a atividade de His-AmtB purificada, estando ela, portanto, em estado conformacional nativo, apta para ensaios *in vitro*.

5.2 Otimização da expressão e purificação do complexo protéico recombinante His-DraT-GlnB de *Azospirillum brasilense*

A proteína DraT é caracterizada por ser capaz de inativar a enzima nitrogenase pela adição do grupo ADP-ribose a subunidade NifH, essa adição é regulada por GlnB que quando está desuridilada em resposta a choque de amônio interage com DraT, esse complexo é estabilizado por ADP (HUERGO et al., 2009), e sua formação permite que DraT possa realizar sua atividade ADP-ribosil transferase (HUERGO, 2006b).

Para um melhor entendimento a nível estrutural das respostas intracelulares aos sinais ambientais envolvidas no processo de ADP-ribosilação de NifH, seria de grande contribuição o conhecimento da estrutura 3D do complexo His-DraT-GlnB. Para que a resolução dessa estrutura seja possível se faz necessário a purificação desse complexo com alto grau de pureza, com proporção estequiometricamente equivalente entre essas proteínas, pois se sabe que esse complexo ocorre em uma razão de 1:1 (monômero de DraT:trímero de GlnB) (HUERGO et al., 2009) e uma concentração relativamente alta (cerca de 10 mg/mL). Isso possibilitaria, posteriormente, o início das etapas de cristalização e a resolução da estrutura dessas proteínas quando complexadas.

Neste trabalho, foi adotada inicialmente a estratégia de purificar o complexo His-DraT-GlnB, por meio da expressão dessas proteínas em células *E. coli* BL21 portando os plamídeos pLHPETDraT e pLHDK5PII sob indução com IPTG por 16 h, a 16 °C, 120 rpm e em meio LB 20mM NH₄Cl (figuras 5, 6 e 7), uma vez que ensaios preliminares, realizados por Huergo et al., (2005), mostraram tais proteínas

purificadas em condições próximas às ideais para fins de cristalização.

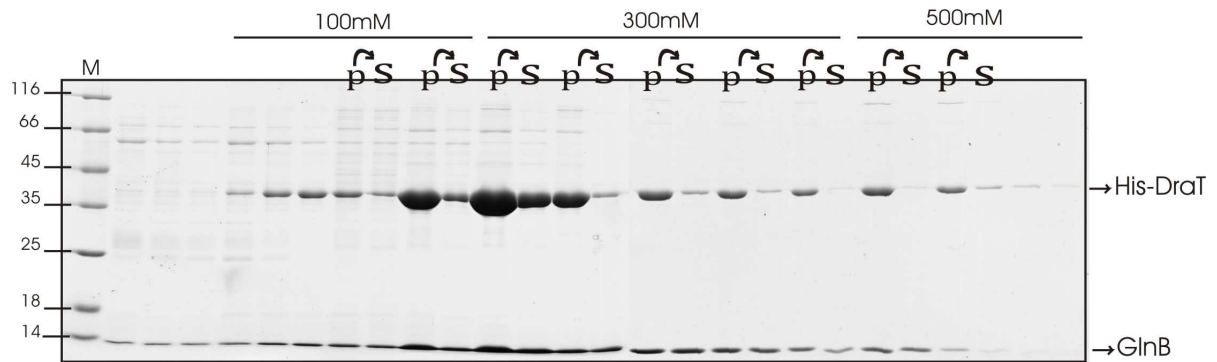


FIGURA 5. Purificação do complexo His-DraT-GlnB em coluna de níquel. *E. coli* BL21 pLHDK5PII/pLHPETdraT. (P) Eluatos da purificação em que se observou precipitado de proteínas, homogeneizados e aplicados no gel sem centrifugar. (S) Sobrenadante das frações P após centrifugação a 30000g (o pellet desta centrifugação foi descartado). A eluição foi feita com gradiente crescente de imidazol. (M) marcador de massa molecular em kDa. SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

Em um primeiro ensaio, foi observado logo que se fez a purificação a formação de precipitado nas frações eluídas. Então essas frações com precipitados foram divididas em duas alíquotas, uma para ser homogeneizada e aplicada no gel de eletroforese SDS-PAGE e outra para ser centrifugada a 30000g. Da alíquota centrifugada foi coletado somente o sobrenadante, o qual foi submetido a eletroforese SDS-PAGE juntamente com a alíquota não centrifugada, para avaliar o quanto de proteínas é purificado e o quando fica solúvel (figura 5). Na figura 5, as proteínas do complexo His-DraT-GlnB apresentaram problemas em sua estequiometria e concentração, sendo mais evidente a baixa solubilidade de His-DraT-GlnB. Aparentemente, o resultado da figura 5 apresenta as frações de proteínas His-DraT e GlnB sendo inicialmente eluídas em 100mM de imidazol, com baixa concentração de ambas as proteínas, porém é onde ocorre o precipitação em menor grau. Na fração de 300mM de imidazol foi observado aumento de His-DraT, mas não na mesma proporção de GlnB, além disso percebe-se uma precipitação em grande quantidade, principalmente de His-DraT. Pode-se constatar também que houve diminuição da fração solúvel nas amostras referentes à 500mM de imidazol e nem tanta diminuição de His-DraT em relação às últimas frações obtidas em tampão 300mM de imidazol. Perante isso, foi hipotetizado que talvez a precipitação seja favorecida em função do aumento na concentração de Imidazol no tampão de eluição, por isso, foi testado uma forma diferente de purificação, em que a eluição foi feita conforme aumento da concentração de NaCl, em coluna de heparina.

Na figura 6, foi visto que a purificação em coluna de heparina apresentou

concentração e pureza de proteínas de maneira insuficiente, ocorrendo também precipitação de proteínas nas frações de mais alta concentração. Entretanto as bandas de His-DraT e GlnB se apresentaram em equivalente intensidade, sugerindo que estavam ocorrendo com estequiometria de aproximadamente 1:1.

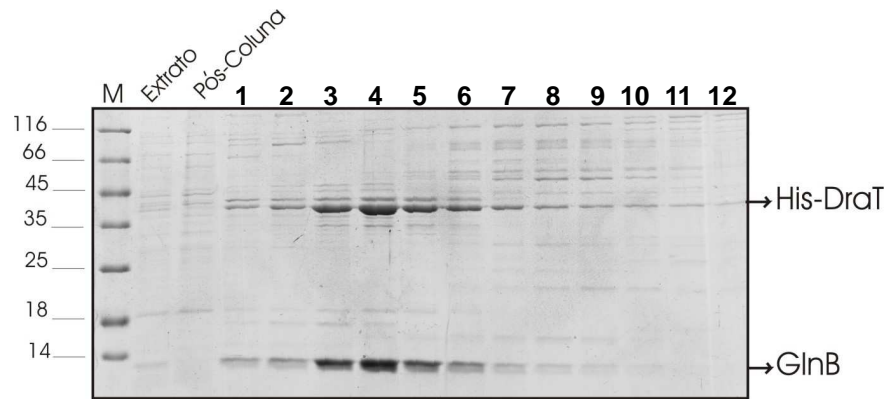


FIGURA 6. Purificação do complexo His-DraT-GlnB em coluna de heparina - sistema AKTA (GE Healthcare). *E. coli* BL21 pLHDK5PII/pLHPETdraT. Extrato de proteínas totais proveniente de 400mL de cultivo celular foi submetido à coluna de heparina de 1 mL em sistema de purificação AKTA (GE Healthcare). O pico de eluição foi obtido com tampão 30% de NaCl (30% de tampão NaCl 1M em tampão NaCl 100mM), aplicadas no gel na sequência de acordo com a numeração das linhas. M - marcador de massa molecular em kDa. SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

A mesma estratégia foi tomada mais uma vez, como mostra a figura 7, mas desta vez a purificação foi realizada em bomba peristáltica, utilizando uma coluna de heparina. Amostras com agregados protéicos também ocorreram nessa purificação, mas desta vez, aparentemente, o fator variante possivelmente tenha sido a expressão desproporcional, uma vez que a banda referente à His-DraT parece estar mais intensa que a de GlnB na linha correspondente ao extrato de proteínas totais da figura 7, da mesma forma que as bandas de His-DraT eluídas com 30% de NaCl em relação às de GlnB. Uma possível explicação para a redução da expressão de GlnB nestas condições seria a instabilidade da manutenção do plasmídeo pLHDK5PII talvez pela baixa estabilidade da ampicilina no meio de cultivo.

Uma vez que ambos os métodos cromatográficos utilizados não produziram resultados satisfatórios, partiu-se para outra estratégia, transformar células *E. coli* BL21 agora com plasmídeo pDK7glnB que expressa GlnB a partir do vetor pDK7 que tem resistência a clorofenicol. Este plasmídeo, assim como o pLHDK5PII (resistência a ampicilina) expressa a proteína GlnB a partir do mesmo promotor, *ptac*. Entretanto, a estabilidade do antibiótico ampicilina em meio de cultivo é inferior à estabilidade do

antibiótico clorofenicol. Portanto, a expressão usando pDK7 poderia, em princípio, ser mais reprodutiva que usando pDK5.

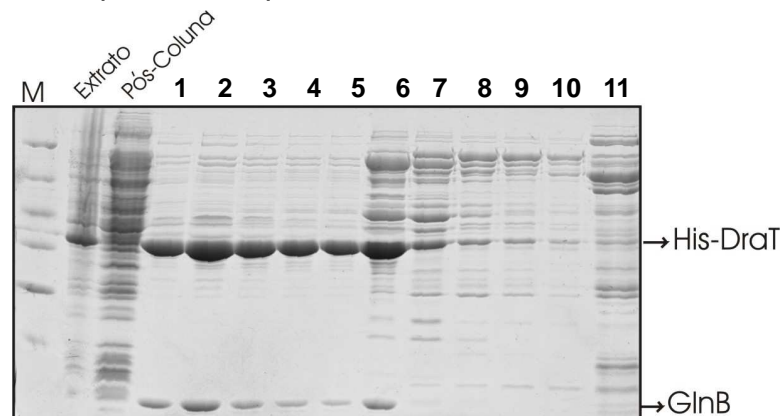


FIGURA 7. Purificação do complexo His-DraT-GlnB em coluna de heparina – bomba peristáltica. *E. coli* BL21 pLHDK5PII/pLHPETdraT. Extrato de proteínas totais proveniente de 400 mL de cultivo celular foi submetido à coluna de heparina de 1 mL em bomba peristáltica. O eluato aplicado no gel (de acordo com sequência numérica das linhas) foi obtido com tampão A com 15% e 35% de B. M- marcador de massa molecular em kDa. SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

Neste caso, células *E. coli* BL21 foram transformadas somente com o plasmídeo pLHDK7glnB, para verificar como esse plasmídeo expressa GlnB em comparação ao plasmídeo inserido juntamente com pLHPETdraT na mesma linhagem celular (figura 8). Esse resultado mostra que há uma diminuição da expressão de GlnB quando expresso junto com His-DraT na mesma célula. Frente a isso, questionou-se se o tempo de indução poderia ser um fator determinante na proporcionalidade da expressão, pois possivelmente haveria um momento em que as proteínas seriam expressas em igual proporção e após isso o plasmídeo com promotor mais ativo prevaleceria. Então foi realizado um teste de indução, em que se submeteram as células *E. coli* BL21 portando os plasmídeos pDK7glnB e pLHPETdraT, a diferentes tempos de indução com IPTG em meio LB suplementado com 20mM NH₄Cl.

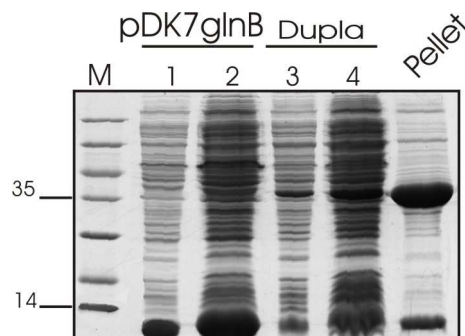


FIGURA 8. Teste de expressão – *E. coli* BL21 pDK7glnB/pLHPETdraT. Extrato de proteínas totais proveniente de 100mL de cultivo celular foi submetido a indução com IPTG por 16 h, a 16°C e 120rpm. 1- Extrato protéico de células portando plasmídeo pDK7glnB (2µL); 2- Igual a 1 porém 3x mais amostra; 3- Extrato protéico de células portando pDK7glnB e pLHPETdraT (2µL); 4- Igual a 3 porém com 3x mais amostra; Pellet- precipitado da centrifugação após sonicação das células duplamente transformadas ressuspensado em tampão de sonicação. M - marcador de massa molecular em kDa; SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

Na figura 9, foi avaliado se houve em algum momento expressão das proteínas DraT e GlnB de maneira estequiometricamente proporcional, com mesma intensidade de bandas em eletroforese SDS-PAGE. O que se pode notar foi uma expressividade de GlnB tão baixa que somente foi possível identificá-la com clareza no precipitado após 24 horas de indução. A banda correspondente a His-DraT apresentou-se com maior intensidade, na altura esperada de aproximadamente 35 KDa. Essa proteína foi mais expressa conforme maior o tempo de indução, da mesma maneira o precipitado também foi evidente, atingindo um grau de precipitação muito maior em 24 hora de indução do que em 5 hora de indução.

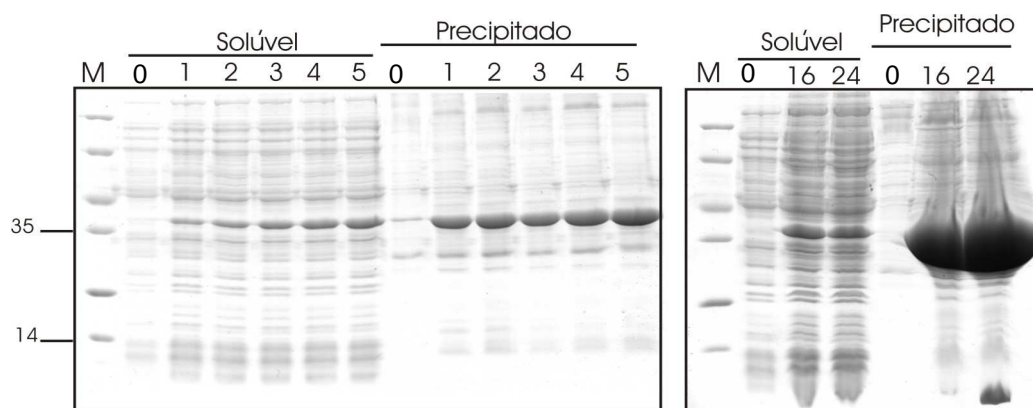


FIGURA 9. Teste de indução - *E. coli* BL21 pLHDK7glnB/pLHPETdraT. Duas alíquotas de 100 mL de cultivo celular foram submetidas à indução com IPTG para expressar as proteínas DraT e GlnB. Amostras de 10mL (centrifugadas e sonicadas em 1mL de tampão de sonicação) foram coletadas em 0,1,2,3,4 e 5 horas para uma das alíquotas e em 0, 16 e 24 horas para a outra. As linhas estão numeradas de acordo as horas de indução. Solúvel: 8 μ L de extrato protéico total em cada linha. Precipitado: 3 μ L precipitado da centrifugação após sonicação ressuspendido em mesmo volume de tampão de sonicação em cada linha. M - marcador de massa molecular em kDa. SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

Tendo a problemática da expressão desigual como o primeiro fator a ser resolvido, tentou-se submeter a célula hospedeira a plasmídeos que expressaram as proteínas a partir do mesmo promotor, para que não haja favorecimento da expressão de um em detrimento de outro plasmídeo. Então, foram inseridos nas células *E. coli* BL21 os plasmídeos com promotor T7, pLHPETdraT e pLMA4 (vetor pT7-7), realizando a expressão por 16 hora sob indução com IPTG, a 16°C, 120 rpm e em meio LB suplementado com 20mM NH₄Cl seguindo então a purificação em coluna de níquel (figura 10).

Na figura 10, é possível concluir que ambas as proteínas do complexo His-DraT-GlnB estão presentes, porém com muito baixa concentração. Observa-se também que ambas as proteínas foram co-eluídas como visto nas linhas 1 e 2, porém, se tem na linha 2 maior grau de pureza e menor quantidade de ambas as

proteínas do complexo His-DraT-GlnB em relação a linha 1.

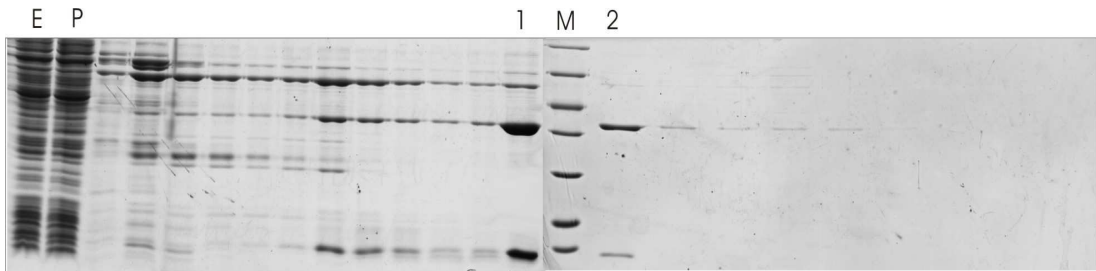


FIGURA 10. Purificação do complexo His-DraT-GlnB - *E. coli* BL21 pLMA4 (GlnB)/pLHPETdraT. Indução com IPTG por 16 horas, a 16 °C e 120 rpm. E- extrato de proteínas totais proveniente de 400mL de cultivo celular; P- (Pós-Coluna) extrato submetido a coluna de níquel de 1 mL. M. 1- fração correspondente a eluição com 300mM de Imidazol; 2 fração seguinte de 1; Eluição com gradiente crescente de imidazol (10, 50, 100, 300, 500). M- marcador de massa molecular em kDa (116, 66, 45, 35, 25, 18 e 14); SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

Não resolvendo o problema da desproporção da expressão das proteínas His-DraT e GlnB, foi realizada a purificação do complexo His-DraT-GlnB pela expressão a partir de um único plasmídeo, o pAbBT Duet (vetor pETduet-1), portando os 2 genes, de His-DraT e de GlnB, visando assim, obter a expressão das proteínas His-DraT e GlnB em uma razão 1:1, haja vista a expressão estar sob controle do mesmo promotor (T7). No entanto, foi possível observar proteínas precipitadas nos tubos com as frações eluídas após a purificação, sugerindo que a precipitação corresponderia à proteína His-DraT e não de GlnB, uma vez que apenas é visível bandas correspondentes a GlnB na figura 11. A inserção do gene *draT* parece ter sido o fator crucial para esse comportamento, pois o plasmídeo pAbBT Duet possui uma região codificante para cauda de histidinas diferente da cauda de pLHPETdraT. O pAbBT Duet possui 6 nucleotídeos entre a região codificante para as 6 histidinas N-terminais e o gene *draT*, já o pLHPETdraT possui 67 nucleotídeos. Essa diferença aparentemente gerou uma conformação tal na estrutura de DraT que possivelmente ocasionou a desestabilização do complexo DraT-GlnB, e a precipitação quase que total de His-DraT, visto que DraT aparentemente só é solúvel quando complexada a proteína GlnB.

F

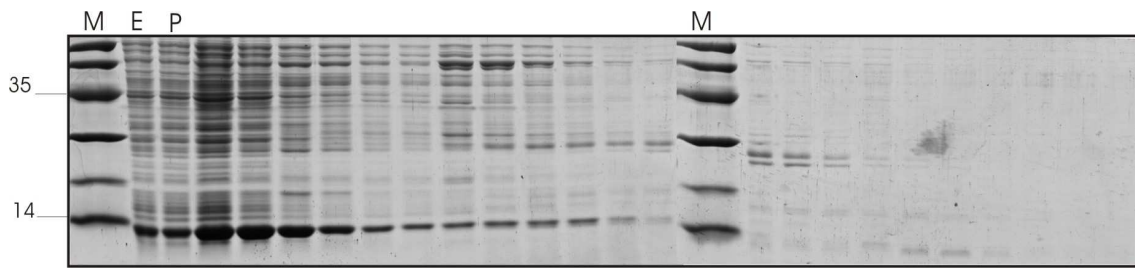
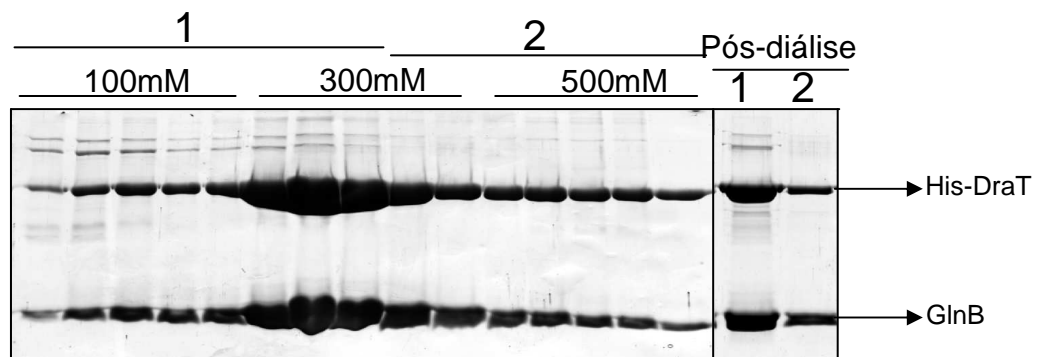


FIGURA 11. Purificação do complexo His-DraT-GlnB - *E. coli* BL21 pAbBDuet (His-DraT e GlnB). Indução em meio LB 20mM NH_4Cl com IPTG por 16 horas, a 16 °C e 120 rpm. E- extrato de proteínas totais proveniente de 400 mL de cultivo celular; P- (Pós-Coluna) extrato submetido a coluna de níquel de 1 mL. F- frações solúveis eluídas com gradiente crescente de imidazol (50, 100, 300, 500) da esquerda para a direita. M- marcador de massa molecular em kDa (116, 66, 45, 35, 25, 18 e 14); SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

Numa ultima tentativa, novamente o plasmídeo pLHDK5PII foi usado para expressão de GlnB. Neste caso, o protocolo de cultivo celular foi modificado, as células foram crescidas a 30°C por 5 horas de indução, tempo o qual foi menor do que o usado nos experimentos anteriores. Surpreendentemente, como mostra a figura 12, obteve-se uma expressão e purificação muito significativa e na forma desejada em relação às adquiridas anteriormente. Essas amostras foram submetidas à diálise e congeladas. Essas frações foram centrifugadas em tubos Centricon (Millipore) apresentando uma concentração de 7,09 mg/mL para amostra da linha 1 pós diálise, na figura 12, e 1,12 mg/mL para amostra da linha 2 pós-diálise. Esta última, sofreu precipitação durante o processo de centrifugação, já a primeira, amostra da linha 1 pós-diálise, apresentou precipitação posteriormente ao processo.



6 DISCUSSÃO

6.1 Otimização da expressão e purificação da proteína recombinante His-AmtB de *Azospirillum brasilense*.

As proteínas da família Amt de muitos organismos em estudo tem sido expressas e purificadas em células hospedeiras *E. coli*, cultivadas em meio rico. Huergo et al. (2007) purificou His-AmtB em linhagem *E. coli* C43 cultivada em meio LB, rico em nutrientes, suplementado com NH₄Cl, para evitar a formação de heterotrímeros entre monômeros de AmtB de *E. coli* e de *A. brasilense* (GRUSWITZ et al., 2010; MARINI et al., 2000). Essa forma de purificação gerou baixo rendimento de proteína purificada e pouca reprodutividade de expressão. Neste trabalho obteve-se boa eficiência na purificação da proteína His-AmtB expressa em *E. coli* GT1000 cultivada em meio mais pobre em nutrientes (M9-glutamina). A escolha de tal linhagem e meio de cultivo foi feita para evitar uma possível titulação de PII pela expressão exógena de AmtB. Tal titulação talvez seja possível, pois, sabe-se que AmtB de *E. coli* interage com PII de *A. brasilense* (RODRIGUES et al, 2011), portanto, talvez AmtB de *A. brasilense* interaja com PII de *E. coli*, fazendo com que AmtB super-expressa sequestre a PII interferindo em outros papéis regulatórios de PII, assim, gerando uma toxicidade a célula, de tal forma que as proteínas que venham a sobreviver no meio de cultivo sejam aquelas cuja expressão de AmtB seja deficiente (BLAUWKAMP e NINFA, 2003). Apesar disso, há proteínas da família Amt de arquea expressas em *E. coli* que estão sendo cultivadas em meio rico (ANDRADE et al., 2005; YILDIZ et al., 2007), talvez pela baixa similaridade entre as proteínas Amt e PII de *E. coli* e de arquea, não permitindo interação entre tais proteínas.

A pureza correspondente a 86% na purificação de His-AmtB, mostrado na figura 2, foi satisfatória uma vez que a purificação foi realizada em apenas uma etapa cromatográfica, sem fracionamento de membrana. Muito embora, na altura de 18 e 14 KDa verifica-se bandas de pequena intensidade referentes a proteínas contaminantes nas três linhas, as quais podem ser relevantes em ensaios *in vitro* de interação com outras proteínas.

A identidade da proteína purificada His-AmtB assim como sua atividade foi confirmada pelos ensaios das figuras 3 e 4 respectivamente, nas quais se pode

verificar que a proteína purificada é reconhecida pelo anticorpo anti-His gerando um padrão de migração eletroforético correspondente ao esperado para AmtB de *A. brasilense* e que a proteína His-AmtB está em sua conformação nativa, pelo fato de ela não perder sua atividade de interação com as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* na presença de ADP.

As mudanças do protocolo anteriormente realizado em nosso laboratório (HUERGO et al., 2007), como a mudança da célula hospedeira de pLHDK7HisAmtB, de *E. coli* C43 para *E. coli* GT1000, assim como a mudança do meio de cultivo, de LB para M9-glutamina foram cruciais para o melhoramento do protocolo de purificação de His-AmtB de *A. brasilense*. A retirada da etapa de eluição com imidazol 100mM também foi importante para a obtenção em maior concentração de His-AmtB e a remoção da trabalhosa etapa de fracionamento propiciou mais praticidade na purificação. Esse protocolo é amplamente utilizado no laboratório, com fiel reprodutividade.

6.2 Otimização da expressão e purificação do complexo protéico recombinante His-DraT-GlnB de *Azospirillum brasilense*

A interação entre DraT e GlnB é muito importante para a regulação da atividade da enzima nitrogenase por meio da ADP-ribosilação da subunidade NifH desta enzima, essa atividade está relacionada com o grau de uridililação de GlnB (HUERGO et al., 2006b). Para a melhor compreensão dos processos regulatório da nitrogenase envolvendo DraT e GlnB, é de grande relevância a determinação da estrutura cristalográfica do complexo entre essas proteínas. Para isso é muito importante a obtenção de DraT e GlnB ligadas, no entretanto, a co-expressão dessa proteínas tem se mostrado difícil, uma vez que esse complexo é aparentemente pouco solúvel perante as condições de purificação utilizadas. Além disso, apesar de termos definido protocolo de expressão com proporção quantitativamente equivalente entre DraT e GlnB, tal expressão não fornece as proteínas suficientemente solúveis.

A baixa solubilidade do complexo DraT-GlnB vista neste trabalho aparentemente ocorre devido a 3 fatores: o grau de saturação, ou seja, o limite de solubilidade de His-DraT-GlnB no tampão solvente, a concentração de imidazol no tampão de eluição e a temperatura de armazenamento dessas proteínas após serem

purificadas.

O grau de saturação, ou limite de solubilidade é proposto devido ter havido precipitação nas frações de maior concentração de proteínas purificadas, independentemente da coluna de afinidade ou tampão de eluição adotado, mas evidentemente, a saturação não contribui sozinha para o favorecimento da precipitação protéica, outro fator que talvez esteja envolvido na precipitação do complexo após a purificação parece ser a concentração de imidazol utilizada para eluição das proteínas da coluna de níquel. O Imidazol possivelmente esteja modificando a estrutura conformacional da proteína His-DraT, como sugerido na figura 5, uma vez que houve redução de predominantemente His-DraT se comparado com GlnB na fração solúvel. Ou ainda, o imidazol esteja modificando a estrutura conformacional do complexo, visto que essa interação é muito estável quando na presença do efector ADP *in vitro* (HUERGO et al., 2009). Além disso, na figura 12, mesmo após ocorrer precipitação de proteínas são obtidas proporções equivalentes entre His-DraT e GlnB e embora His-DraT tenha precipitado prevalentemente no experimento da figura 5, houve uma leve redução do conteúdo solúvel de GlnB depois da centrifugação.

Em se tratando da concentração de imidazol na indução de precipitação protéica, pode-se verificar, nas figuras 5 e 12, que em concentrações mais altas deste reagente, houve maior conteúdo de proteínas precipitadas. Na figura 5, houve, na transição do eluato com 300mM de imidazol para 500mM, um leve aumento de proteína eluída em relação à última fração de 300mM, porém, tal aumento não se apresenta em mesmo grau solúvel após centrifugação e, quando a primeira fração de 500mM é comparada com a penúltima fração de 300mM, percebe-se uma amostra de concentrações protéica muito próximas, mas com conteúdo solúvel maior na fração de 300mM de imidazol do que na de 500mM. Além disso, ao comparar a primeira fração eluída com 500mM de imidazol com as frações em 100mM, fica ainda mais evidente a diferença na quantidade de proteína solúvel em relação aos níveis de imidazol no tampão de eluição. Na figura 12, em que se obteve uma concentração relativamente alta das proteínas His-DraT e GlnB, foi claramente sugerida a formação desse padrão de precipitação, mostrado na alíquota 2 (eluatos com prevalência de frações a 500mM de imidazol) uma mais precoce precipitação em comparação com a alíquota 1 (eluatos com prevalência de frações a 100mM e 300mM de imidazol).

Um terceiro fator diz respeito à temperatura de armazenamento das alíquotas purificadas. Verificou-se que ao estocar a amostra a 4 °C de um dia para o outro, antes ou depois de dialisada, há um grau de precipitação maior do que se tais amostras forem congeladas, sugerindo que a solubilidade é desfavorecida a 4°C.

Levando em conta que o imidazol possivelmente seja um fator que favoreça a precipitação do complexo His-DraT-GlnB, a purificação em coluna de heparina torna-se uma estratégia promissora, por não utilizar o imidazol como agente de eluição, e embora tenha ocorrido precipitação de proteínas nas purificações em coluna de heparina (figuras 6 e 7), pode-se sugerir que isso tenha se sucedido pelo armazenamento a 4 °C, tanto que, as amostras da purificação representada na figura 12 foram congeladas, e com isso, houve um retardo da precipitação a qual ocorreu em muito menor grau que nas demais condições de purificação.

Como alternativa possível para a purificação do complexo His-DraT-GlnB, seria purificar as proteínas DraT e GlnB separadamente e então uni-las em igual proporção. Porém haveria a dificuldade de se acertar a proporção de maneira precisa, pois a variante dos métodos de dosagem de proteínas geraria um erro, diferentemente do que ocorre na co-purificação, pois aparentemente se houver GlnB suficiente, ela fica retida por His-DraT na coluna de níquel de maneira estequiométrica. Além disso, o rendimento da purificação de His-DraT em nosso laboratório foi extremamente baixo, devido à alta taxa de precipitação, sendo obtido em maior concentração quando co-purificada com GlnB.

Uma relevante observação pôde ser feita referente à influência da cauda de histidina na solubilidade de DraT. Possivelmente esse fator interfira na solubilidade de His-DraT e também na interação com GlnB, pois como mostrado na figura 11, uma cauda menor na região N-terminal de His-DraT expressa em pAbBTDuet culminou na desestabilização do complexo e na precipitação de His-DraT, talvez justamente pelo desligamento de His-DraT-GlnB, diferentemente da His-DraT expressa em pLHPETdraT, que codifica uma His-DraT com forte interação com GlnB, e talvez por isso seja mais solúvel.

9- CONCLUSÕES

A proteína recombinante His-AmtB foi purificada com rendimento acima do obtido anteriormente em uma única etapa cromatográfica. O protocolo obtido é potencialmente passível de ser implantado para a purificação de proteínas AmtB de outros organismos.

O protocolo de purificação do complexo His-DraT-GlnB foi padronizado para obtenção de equivalente proporção entre tais proteínas.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDRADE, S.L., DICKMANN, A., FICNER, R., EINSLE, O., Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, p. 14994–14999, 2005.

ARAÚJO, L.M., HUERGO, L.F., INVITTI, A.L., GIMENES, C.I., BONATTO, A.C., MONTEIRO, R.A., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., CHUBATSU, L.S. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon *in vitro* uridylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.41, n.4, p.289-294, 2008.

ARAÚJO, L. M., MONTEIRO, R. A., SOUZA, E. M., STEFFENS, M. B. R., RIGO, L. U., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S, GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli* , **Res. Microbiol.** v. 155, p. 491–495, 2004.

ATKINSON, M. R., NINFA, A. J., Role of GlnK signal transduction protein in regulation assimilation in *Escherichia coli*, **Mol. Microbiol.**, v. 29(2), p. 431-447, 1998.

BLAKEY, D., LEECH, A., THOMAS, G.H., COUTTS, G., FINDLAY, K., MERRICK, M., Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry, **Biochem. J**, v. 364, p. 527–535, 2002.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Can. J Microbiol.** v. 50, p. 521-577, 2004.

BLAUWKAMP, T.A., NINFA, A.J., Antagonism of PII signalling by the AmtB protein of *Escherichia coli*, **Mol. Microbiol.**, v 48, p. 1017–1028, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.

DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 2, p. 449-463, 1998.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 178, p. 4143-4149, 1996.

DÖBEREINER J., PEDROSA F. O., **Nitrogen-fixing in non leguminous crop plants**, Science tech publisher/Springer – verlag, 1987.

DURAND, A., MERRICK, M. *In vitro* analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-oxoglutarate..**J. Biol. Chem.** v. 6, n. 281(40), p.29558-29567, 2006.

CARREÑO-LÓPEZ, R., SÁNCHEZ, A., CAMARGO, N., ELMERICH, C., BACA, E. B., Characterization of *chsA*, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7, **Arch Microbiol**, v. 191, p. 501–507, 2009.

COUTTS, G., THOMAS, G., BLAKEY, D., MARRICK, M., Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by ammonium transporter AmtB, **EMBO J.** v 21, n 4, p 536-545, 2007.

FIBACH-PALDI, S., BURDMAN S. & OKON Y., Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS**, p. 1-10, 2011.

FOKINA, O.; CHELLAMUTHU, V. R.; FORCHHAMER, K.; ZETH, K., Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein, **PNAS**, v. 107, n. 46, p.19760–19765, 2010.

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

GRUNWALD, S. K., D. P. LIES, G. P. ROBERTS, P. W. LUDDEN, Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum* strains overexpressing the regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase activating glycohydrolase. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 628–635, 1995.

GRUNWALD, S. K., LUDDEN, P. W., NAD-Dependent Cross-Linking of Dinitrogenase Reductase and Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase from *Rhodospirillum rubrum*, **J.bacteriol.**, v. 179, n. 10, p. 3277–3283, 1997

GRUSWITZ, F.; CONNELL III, J. O.; STROUD, R. M., Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. **PNAS**, v. 104, n. 1, p. 42 – 47, 2007.

GRUSWITZ, F., CHAUDHARY, S., HO, J.D., SCHLESSINGER, A., PEZESHKI, B., HO, C.M., SALI, A., WESTHOFF, C.M., STROUD, R.M., Function of human Rh based on structure of RhCG at 2.1 Å, **PNAS**, v. 107, p. 9638–9643, 2010.

HARTMANN, A., BALDANI, J.I. **The genus *Azospirillum***. The prokaryotes (5): p.115-140. Springer New York, 2006.

HUERGO, L. F., SOUZA, M. E., STEFFENS, M. B. R., YATES, M. G., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S.; Effects of over-expression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium-dependent post-translational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*, **Arch Microbiol.**, v. 183, pp.209–217, 2005.

HUERGO, L. F., SOUZA, E. M., ARAÚJO, M. S., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S., STEFFENS, M. B. R., MERRICK, M., ADP-ribosylation in dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB dependent membrane of sequestration DraG., **Mol. Microbiol.** v. 59, p. 326 – 337, 2006 (a).

HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B.; MERRICK, M. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Lett.** v.580(22), p. 5232-6, 2006 (b).

HUERGO, L. F.; MERRICK, M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; ARAUJO, L.M.; SOUZA, E. M. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Mol. Microbiol.** v. 66(6), p. 1523-35, 2007.

HUERGO, L.F., MERRICK. M., MONTEIRO. R.A., CHUBATSU. L.S., STEFFENS. M.B., PEDROSA. F.O., SOUZA, E.M. *In vitro* interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. **J. Biol. Chem.** v.13, n.284(11), p. 6674-6682, 2009.

HUNGRIA, M., CAMPO, R. J., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil, **Plant Soil**, v. 331, p. 413–425, 2010.

JAVELLE, A., THOMAS, G., MARINI, A., M., KRAMER, R., e MERRICK, M., In vivo functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase, **Biochem. J**, v 390, p 215-222, 2005.

JIANG, P., NINFA, A.J. *Escherichia coli* PII signal transduction protein controlling nitrogen assimilation acts as a sensor of adenylate energy charge *in vitro*. **Biochemistry**. v. 13, n.46(45), p.12979-12996, 2007.

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

KAMBEROV, E. S., ATKINSON, M. R., CHANDRAN, P., NINFA, A. J., Effect of mutations in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28294–28299. 1994.

KHADEMI, S., O'CONNELL III, J., REMIS, J., ROBLES-COLMENARES, MIERCKE Y., L. J. W., STROUD, R. M., Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å, **Science**, v 305, p 1587-1594, 2004

KHADEMI S. E STROUD R. M., The Amt/MEP/Rh Family: Structure of AmtB and the Mechanism of Ammonia Gas Conduction, **Physiology**, v. 21, p. 419-429, 2006.

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

LEIGH J.A.; DODSWORTH J. A, Nitrogen regulation in bacteria and archaea, **Annu. Rev. Microbiol.** v.61, p. 349 – 377, 2007.

LI, X. D, HUERGO, L. F., GASPERINA, A., PEDROSA, F. O., MERRICK, M., WINKLER, F. K., Crystal Structure of Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase (DRAG) Reveals Conservation in the ADP-Ribosylhydrolase Fold and Specific Features in the ADP-Ribose-binding Pocket, **J. Mol. Biol.**, v. 390, p. 737–746, 2009.

LIN, H., Nicotinamide adenine dinucleotide:beyond a redox coenzyme. **Org. Biomol. Che.**, v. 5, p.2541–2554, 2007.

LJUNGSTROM, E.; YATES, M. G.; NORDLUND, S. Purification of the activating enzyme for the Fe-protein of nitrogenase from *Azospirillum brasilense*, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 994, p. 210-214, 1989.

LOWERY, R. G., P. W. LUDDEN.. Purification and properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Biol. Chem.**, v, 263, p. 16714–16719, 1988.

LOWERY, R. G., P. W. LUDDEN. Effect of nucleotides on the activity of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from *Rhodospirillum rubrum*. **Biochemistry**, v. 28, p.4956–4961,1989

LUPO, D., LI, X.D., DURAND, A., TOMIZAKI, T., CHERIF-ZAHAR, B., MATASSI, G., MERRICK, M., WINKLER, F.K., The 1.3-Å resolution structure of Nitrosomonas europaea Rh50 and mechanistic implications for NH₃ transport by Rhesus family proteins, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.104, p. 19303–19308, 2007.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can. J. Microbiol.** v. 37, p. 549-553, 1991.

MARINI, A.M., SPRINGAEL, J.Y., FROMMER, W.B., ANDRE, B., Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein, **Mol. Microbiol.**, v.35, p.378–385, 2000

MOURE, V. R., RAZZERA, G., ARAÚJO, L. M., OLIVEIRA, M. A. S., GERHARDT E. C. M., MÜLLER-SANTOS, M, ALMEIDA, F. PEDROSA, F. O., VALENTE, A. P., SOUZA, E. M., HUERGO, L. F., Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step, **Protein Expression and Purification**, v. 81, p. 83–88, 2011.

PAWLOWSKI, A., RIEDEL, K.U., KLIPP, W., DREISKEMPER, P., GROSS, S., BIERHOFF, H., DREPPER, T., MASEPOHL, B., Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 5240–5247, 2003

RADCHENKO, M. V., THORNTON, J., MERRICK, M., Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP and 2-oxoglutarate, **J. Biol. Chem.** v. 285, p. 31037-31045, 2010.

RODRIGUES, T. E., SOUZA, V. E.P., MONTEIRO, R. A., GERHARDT, E. C.M., ARAÚJO, L. M., CHUBATSU, L. S., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., HUERGO, L. F., *In vitro* interaction between the ammonium transport protein AmtB and partially uridylylated forms of the PII protein GlnZ, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1814, p. 1203–1209, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

TREMBLAY P. L.; HALLEMBECK P. C. Of blood, brain and bacteria, the AmtB/Rh transporter family emerging role of AmtB as a unique microbial sensor. **Mol. Microbiol. Rev.** v 71, p 12-22, 2008.

TRUAN, D.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; MERRICK, M.; LI, X. D.; WINKLER, F. K., The new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site, **J. Mol. Biol.** v. 400, p. 531–539, 2010.

VAN DOMMELEN, A., KEIJERS, V., VANDERLEYDEN, J., DE ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 180, n.10, p.2652-2659,1998.

ZHANG, Y., BURRIS, R. H., LUDDEN, P. W. e ROBERTS, G. P., Posttranslational Regulation of Nitrogenase Activity by Anaerobiosis and Ammonium in *Azospirillum brasilense*, **J. Bacteriol**, v. 175, n. 21, p. 6781-6788, 1993

ZHANG, Y., BURRIS, R.H., LUDDEN, P.W., ROBERTS, G.P., Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS, Microbiol. Lett.**, v. 152, p. 195–204, 1997

ZHENG, L., KOSTREWA, D., BERNECHE, S., WINKLER, F. K., LI, X.D., The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*, **PNAS**, v 101, n 49, p 17090-17095, 2004.

ZHU, Y., CONRAD, M.C., ZHANG, Y. AND ROBERTS, G.P. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB variants that are altered in their ability to interact with different targets in response to nitrogen status signals,. **J. Bacteriol**, v 188, p 1866–1874, 2006.

YILDIZ, O., KALTHOFF, C., RAUNSER, S., KUHLEBRANDT, W., Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake, **EMBO J.**, v. 26, p. 589–599, 2007

WINKLER, F. K., Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia, **Pflugers Arch.** v. 451, p. 701-707, 2006.