

ANA CLAUDIA BONATTO

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DA MODIFICAÇÃO
PÓS-TRADUCIONAL DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE
*Herbaspirillum seropedicae***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadores:
Prof^a Dr^a Elaine Machado Benelli
Prof Dr Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA
2007

Orientadores: Elaine Machado Benelli

Emanuel Maltempi de Souza

**Aos meus pais Cláudio e Alvaneve
e à minha irmã Juliana.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Elaine Machado Benelli, pela orientação, amizade e por todos os ensinamentos;

ao Prof. Dr. Emanuel Maltempo de Souza, pelas sugestões, orientação e atenção;

ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio, pelas orientações, sugestões e pelo apoio;

à Prof^a. Dr^a. Leda Satie Chubatsu, pelos primeiros ensinamentos de bioquímica, atenção e sugestões e pelo apoio enquanto coordenadora do curso de Pós-Graduação em Bioquímica;

aos demais professores do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular: Dr^a. Rose Adele Monteiro, Dr^a. Maria Berenice R. Steffens, Dr^a. Liu Un Rigo e Dr. Leonardo Magalhães Cruz pela colaboração;

ao professor Marshall Geoffrey Yates, pelas sugestões, correções e atenção;

à Prof^a. Dr^a. Gisele Klassen, pela colaboração e sugestões;

ao apoio financeiro da CAPES e do CNPq;

aos amigos Roseli Prado, Valter Antônio de Baura e Julieta Pie, pela dedicação, apoio e carinho;

às parceiras de PII, Luíza e Lílian, pela colaboração nos experimentos e pela troca de idéias;

aos colegas da 275, Jú Inaba, Márcia, Gustavo, Geraldo e Marcelo pela ótima convivência durante estes anos;

às amigas Fernanda, Fabiane e Michele H., pelas atividades “extra-laboratório”, pelo carinho e atenção;

aos colegas de laboratório Giovana, Rafael, Liziane, André Luis, Anelis, Michele Tadra, Jú Osaki, Viviane, Giovani, Tuca, Marco Aurélio, Marco Antônio, Halisson, Larissa C, Larissa T, Helisson, Luciano, Camila, Daniela e Michele Torres, pela colaboração diária e amizade;

às amigas Magda e Patrícia, pela amizade e colaboração;

aos amigos Simone, Ricardo, Karen, Thales, Patrícia e Marcus, por estarem ao meu lado em todos os momentos;

aos amigos da família LHP, Ana Paty, José Luis, Mariah, Acélio, Pedro, André, Jorge, Eliel, Rafael, Denise e Caio, que sempre me incentivaram a ir à luta;

à minha madrinha Beatriz Zonta (tia Bea), pela ajuda indispensável durante os estudos de graduação e pós-graduação;

à minha família: “Dona Neve”, “Seu Bonatto” e Juli (ou Juh, pra ser mais moderno), por serem uma família presente, por serem amigos para todas as horas e por confiarem sempre em mim;

e finalmente, a Deus, por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CONTROLE DO METABOLISMO EM BACTÉRIAS.....	1
1.2 PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII.....	2
1.3 ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS PII.....	5
1.4 MODIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII EM RESPOSTA A MUDANÇAS FISIOLÓGICAS.....	9
1.4.1 Uridililação das Proteínas PII.....	11
1.4.2 Adenililação das Proteínas PII.....	13
1.4.3 Fosforilação das Proteínas PII.....	14
1.5 INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII COM MOLÉCULAS EFETORAS.....	15
1.6 FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS PII NO SISTEMA NTR.....	16
1.7 FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS PII NA CAPTAÇÃO DE AMÔNIO.....	20
1.8 ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS PII NO CONTROLE DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	21
1.9 FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS PII NO CONTROLE DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA.....	24
1.9.1 Controle da Atividade de NifA em organismos da Classe γ -Proteobacteria....	25
1.9.2 Controle da Atividade de NifA em organismos da Classe α - Proteobacteria. 27	
1.9.3 Controle da Atividade de NifA em organismos da Classe β - Proteobacteria..	28
1.10 OUTRAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS PII.....	31
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 ESTIRPES E PLASMÍDEOS.....	36
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	37
4.2.1 Meios Utilizados para o Cultivo de <i>E. coli</i>	37

4.2.2 Antibióticos.....	37
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	38
4.4 MANIPULAÇÃO GÊNICA.....	38
4.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	38
4.6 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).....	38
4.7 ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES PARA PROTEÍNAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR (SCHAGGER & von JAGOW, 1987).....	39
4.8 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES.....	39
4.9 CLONAGEM DOS GENES <i>glnB</i> DE <i>H. seropedicae</i> COM MUTAÇÕES NAS SEQUÊNCIAS QUE CODIFICAM PARA OS RESÍDUOS G108W E Q3R/T5A NO VETOR DE EXPRESSÃO pET29a+.....	40
4.10 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	40
4.11 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB, GlnK E GlnB MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i>	41
4.12 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i>	42
4.13 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i>	43
4.14 ENSAIOS DE URIDILILAÇÃO.....	43
4.14.1 Efeito da Concentração da Enzima GlnD.....	44
4.14.2 Efeito do Tempo.....	45
4.14.3. Efeito da Concentração de 2-oxoglutarato.....	45
4.14.4. Efeito da Concentração de ATP.....	45
4.14.5. Efeito da Concentração de ADP e AMP.....	45
4.14.6. Efeito da Concentração de Glutamina.....	46
4.14.7. Uridililação da Proteína Mutante GlnB Q3R/T5A.....	46
4.15. ENSAIOS DE DESURIDILILAÇÃO.....	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 CLONAGEM DOS GENES <i>glnB</i> DE <i>H. seropedicae</i> MUTANTES (G108W E Q3R/T5A) NO VETOR DE EXPRESSÃO pET29a+.....	48

5.2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i> E GlnB MUTANTES.....	48
5.3. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i> E GlnB MUTANTES.....	49
5.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i>	58
5.5. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i>	58
5.6. URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>H. seropedicae</i>	62
5.6.1. Efeito da Concentração de GlnD na Uridililação das Proteínas PII de <i>H. seropedicae</i>	64
5.6.2. Efeito do Tempo de Reação na Uridililação das Proteínas PII de <i>H. seropedicae</i>	67
5.6.3. Efeito da Concentração dos Efetores 2-oxoglutarato e ATP na Uridililação das Proteínas PII de <i>H. seropedicae</i>	69
5.6.4. Efeito da Concentração das Moléculas ADP e AMP na Uridililação das Proteínas PII de <i>H. seropedicae</i>	69
5.6.5. Efeito da Concentração de Glutamina na Uridililação das Proteínas PII de <i>H. seropedicae</i>	74
5.6.6. Perfil de Uridililação da Proteína Mutante GlnB Q3R/T5A.....	79
5.7. DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>H. seropedicae</i>	80
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÕES	91
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i> E PROTEÍNAS PII DE OUTRAS PROTEOBACTÉRIAS.....	6
FIGURA 2 – MODELO ESTRUTURAL DOS MONÔMEROS DAS PROTEÍNAS GlnB DE <i>H. seropedicae</i> E GlnB E GlnK DE <i>E. coli</i>	8
FIGURA 3 – MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GlnB DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	10
FIGURA 4 – CASCATA REGULADORA DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO DE <i>Escherichia coli</i>	18
FIGURA 5 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS GlnB DE <i>H. seropedicae</i> E SUAS FORMAS MUTANTES.....	30
FIGURA 6 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnB DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> (RB9065 λ DE3).....	50
FIGURA 7 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnK DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> (RB9065 λ DE3).....	51
FIGURA 8 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MUTANTE GlnB G108A/P109A EM <i>E. coli</i> (RB9065 λ DE3).....	52
FIGURA 9 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MUTANTE GlnB G108W EM <i>E. coli</i> (RB9065 λ DE3).....	53
FIGURA 10 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MUTANTE GlnB Q3R/T5A EM <i>E. coli</i> (RB9065 λ DE3).....	54
FIGURA 11 – PROTEÍNAS GlnB e GlnK DE <i>H. seropedicae</i> PURIFICADAS.....	55
FIGURA 12 – PROTEÍNAS MUTANTES GlnB G108A/P109A, GlnB G108W E GlnB Q3R/T5A PURIFICADAS.....	56
FIGURA 13 – INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> (RB9065 λ DE3).....	59
FIGURA 14 – PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i> PURIFICADA.....	60

FIGURA 15 – PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	63
FIGURA 16 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GlnD SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE <i>H. seropedicae</i>	65
FIGURA 17 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GlnD SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	66
FIGURA 18 – EFEITO DO TEMPO NO PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i> E GlnB MUTANTES	68
FIGURA 19 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OXOGLUTARATO NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i> E GlnB MUTANTES.....	70
FIGURA 20 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i> E GlnB MUTANTES.....	71
FIGURA 21 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ADP E AMP NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE <i>H. seropedicae</i>	72
FIGURA 22 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ADP E AMP NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	73
FIGURA 23 – EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE <i>H. seropedicae</i>	75
FIGURA 24 – EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	76
FIGURA 25 – EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB G108A/P109A DE <i>H. seropedicae</i>	77
FIGURA 26 – EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB G108W DE <i>H. seropedicae</i>	78
FIGURA 27 – EFEITO DO TEMPO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB Q3R/T5A DE <i>H. seropedicae</i>	81
FIGURA 28 – EFEITO DO TEMPO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE <i>H. seropedicae</i>	82

FIGURA 29 – EFEITO DO ATP NA DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	83
FIGURA 30 – EFEITO DO ADP NA DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	84
FIGURA 31 – EFEITO DO ADP E DO ATP NA DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES E PLASMÍDEOS.....	36
TABELA 2 – PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	57
TABELA 3 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	- adenosina difosfato
Ala	- alanina
Amp	- ampicilina
AMP	- adenosina monofosfato
Arg	- arginina
Asp	- aspartato
ATP	- adenosina trifosfato
cm	- centímetro
CTP	- citosina trifosfato
Cys	- cisteína
D.O.	- densidade óptica
DTT	- ditioneitol
EDTA	- ácido etilenodiamino-tetra-acético
FAD	- flavina adenina dinucleotídeo
Gln	- glutamina
Gly	- glicina
GOGAT	- glutamato sintase
GS	- glutamina sintetase
GTP	- guanina trifosfato
His	- histidina
IPTG	- isopropil-tio-galactosídeo
kDa	- quilodaltons
Km	- canamicina
NADP	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Pi	- fosfato inorgânico
PMSF	- fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPI	- pirofosfato inorgânico
Pro	- prolina
rpm	- rotações por minuto
SDS	- dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Ser	- serina
Tc	- tetraciclina
TEMED	- N, N, N', N' - tetrametiletlenodiamina
TRIS	- tris(hidroximetil)-aminometano
Trp	- triptofano
Tyr	- tirosina
UMP	- uridilil monofosfato
UTP	- uridilil trifosfato
V	- volts

RESUMO

As proteínas do tipo PII são uma família de proteínas transdutoras de sinal encontradas em Bacteria, Archaea e Eucarya. Estas proteínas estão envolvidas com o processamento e transmissão dos sinais de nitrogênio, carbono e energia para outras proteínas envolvidas no metabolismo de nitrogênio. Nas γ -proteobactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, foram identificadas duas proteínas do tipo PII, GlnB e GlnK. As proteínas PII de *E. coli* ligam-se diretamente às moléculas de 2-oxoglutarato e ATP, sinais de carbono e energia, respectivamente. O nível de nitrogênio celular é sinalizado pela molécula de glutamina e transmitido às proteínas GlnB e GlnK pela enzima bifuncional GlnD. Em condições limitantes de nitrogênio a proteína GlnD transfere um grupo UMP para as proteínas PII (reação de uridililação) e quando os níveis de nitrogênio aumentam, a proteína GlnD remove o grupo UMP (reação de desuridililação). *Herbaspirillum seropedicae* é uma β -proteobactéria diazotrófica isolada de gramíneas de interesse comercial. Neste organismo, muitos genes que codificam para proteínas envolvidas no metabolismo de nitrogênio já foram identificados, entre eles os genes *glnB*, *glnK* e *glnD*. Neste trabalho, as proteínas GlnB, GlnK e GlnD de *H. seropedicae* e as proteínas mutantes GlnB G108A/P109A, GlnB G108W e GlnB Q3R/T5A foram purificadas em suas formas nativas. Estas proteínas foram caracterizadas através de ensaios de uridililação *in vitro*. As reações foram avaliadas em géis de eletroforese nativa, onde as quatro formas das proteínas PII podem ser visualizadas: PII, PII (UMP)₁, PII (UMP)₂ e PII (UMP)₃. Os resultados mostraram que as proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* são uridililadas e desuridililadas pela proteína GlnD. A taxa de uridililação da proteína GlnB foi maior do que GlnK. A uridililação das proteínas GlnB, GlnK e GlnB mutantes requer a presença de ATP e 2-oxoglutarato e é inibida por glutamina. As moléculas ADP e AMP também foram capazes de promover a uridililação das proteínas GlnB e GlnK, sendo que a reação de uridililação da proteína GlnB parece ter maior especificidade pela molécula de ATP enquanto a proteína GlnK é uridililada com a mesma eficiência com ATP ou ADP. Por outro lado, a desuridililação da proteína GlnK foi tão eficiente quanto a da proteína GlnB, e nesta reação, o ATP foi mais eficiente que o ADP como molécula efetora para ambas as proteínas. A proteína GlnB G108A/P109A apresentou um perfil de uridililação similar ao da

proteína GlnB nativa, enquanto o da proteína GlnB G108W, foi similar a proteína GlnK. A proteína GlnB Q3R/T5A apresentou um perfil de migração distorcida no gel nativo e foi avaliada em separado através de gel desnaturante para proteínas de baixo peso molecular. O perfil de uridililação observado para esta proteína foi similar ao da proteína GlnB nativa. Os resultados sugerem que os níveis dos efetores interferem na modificação das proteínas GlnB e GlnK e que a proteína GlnK parece ser menos sensível às mudanças dos níveis de ATP. Além disso, a topologia da região C-terminal da proteína GlnB de *H. seropedicae* pode influenciar nas interações com a proteína GlnD ou com as moléculas efetoras.

ABSTRACT

The PII protein family is a group of signal transducing proteins found in Bacteria, Archaea and Eucarya. These proteins process and transmit nitrogen, carbon and energy signals to proteins involved in nitrogen metabolism. In the γ -proteobacteria *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, two PII-like proteins were identified: GlnB and GlnK. The *E. coli* PII proteins bind directly to the carbon and energy signals, 2-oxoglutarate and ATP, respectively. The cellular nitrogen level is signaled through the glutamine concentration and is transmitted to the GlnB and GlnK proteins by the bifunctional enzyme GlnD. Under nitrogen limited conditions, the GlnD protein transfers an UMP group to PII proteins (uridylylation reaction) and, when nitrogen levels are high, GlnD removes the UMP group (deuridylylation reaction). *Herbaspirillum seropedicae* is a β -proteobacterium isolated from grasses of commercial importance. In this organism, many genes that code for proteins involved in nitrogen metabolism have been identified, including *glnB*, *glnK* and *glnD*. In this work, the *H. seropedicae* GlnB, GlnK and GlnD proteins and the GlnB mutant proteins, GlnB G108A/P109A, GlnB G108W and GlnB Q3R/T5A, were purified in their native forms. The purified proteins were characterized by *in vitro* uridylylation assays. The GlnB and GlnK uridylylation states were determined by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, which allows separation of the four possible forms of the PII proteins: non uridylylated, PII (UMP)₁, PII (UMP)₂ and PII (UMP)₃. Both the GlnB and GlnK proteins from *H. seropedicae* were uridylylated and deuridylylated by the GlnD protein; in these experiments, the GlnB uridylylation rate was greater than that of GlnK. The uridylylation of GlnB, GlnK and the GlnB mutant forms required both ATP and 2-oxoglutarate, and was inhibited by glutamine. ADP and AMP were also able to promote GlnB and GlnK uridylylation: GlnB uridylylation was more efficient with ATP, whereas GlnK was uridylylated with ADP as effectively as with ATP. In contrast, GlnB and GlnK deuridylylation rates were similar and ATP was more efficient than ADP as effector for both proteins. The GlnB G108A/P109A protein presented a uridylylation profile similar to the wild- type GlnB, whereas the uridylylation of GlnB G108W was similar to GlnK. The GlnB mutant Q3R/T5A did not show defined bands on native gels and was evaluated through denaturing polyacrylamide gel electrophoresis for low molecular weight proteins. The observed

uridylation profile of this protein was similar to that of the wild-type GlnB. The results suggest that the effector levels control the GlnB and GlnK modification reactions and GlnK protein seems to be less sensitive to ATP levels. In addition, the C-terminus topology of *H. seropedicae* GlnB protein may be important in the interaction with GlnD or effectors.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTROLE DO METABOLISMO EM BACTÉRIAS

As bactérias possuem mecanismos para monitorar a disponibilidade de nutrientes no meio e transmitir esta informação para as devidas rotas metabólicas adaptando seu metabolismo a diferentes condições. Além das respostas específicas às variações nutricionais, as bactérias integram informações de diferentes ramos do metabolismo para coordenar a expressão de muitos genes de vias metabólicas distintas (COMMICHAU et al. 2006). A expressão destes genes é regulada primariamente por fatores transcricionais pleiotrópicos, que desencadeiam a transcrição de vários operons em resposta aos sinais metabólicos (THIEFFRY et al. 1998; PEREZ-RUEDA & COLLADO-VIDES, 2000). Exemplos destes fatores transcricionais em *Escherichia coli* incluem Crp, um sensor primário de disponibilidade de carbono, NtrBC, um sistema de dois componentes sensor dos níveis de nitrogênio, CysB, sensor da disponibilidade de enxofre, e Fur, sensor da disponibilidade de ferro (ZHANG et al. 2005). Interações funcionais entre as vias reguladas por estes fatores transcricionais devem coordenar as atividades de diferentes metabólitos de maneira que o suprimento de um tipo de nutriente afeta vias relacionadas ao metabolismo de outro tipo de nutriente (ZHANG et al. 2005; COMMICHAU et al. 2006). Assim, o metabolismo de carbono não é apenas controlado por seus metabólitos, mas também pela disponibilidade de nitrogênio e outros nutrientes. Da mesma forma, o metabolismo de nitrogênio, enxofre, fósforo e ferro em bactérias é controlado pelas fontes de carbono em conjunto com os sinais específicos de cada via (QUAN et al. 2002; BLENCHE et al. 2003; ZHANG et al. 2005; CHOI & SAIER, 2005).

A interação entre o metabolismo de carbono e nitrogênio em bactérias é resultado da atividade do sistema de fosfotransferases e permeases de açúcares (PTS) e das funções exercidas pelas proteínas do tipo PII (COMMICHAU et al. 2006). Em muitas bactérias, açúcares são transportados e fosforilados pelo sistema PTS. Este sistema é composto de duas proteínas gerais, enzima I (EI) e HPr, e um conjunto de permeases açúcar-específicas (EII) (POSTMA et al. 1993). Além disso,

o PTS também exerce funções regulatórias no controle da expressão gênica, metabolismo e quimiotaxia. Em proteobactérias foram identificadas proteínas do sistema PTS que provavelmente não estão envolvidas no transporte de açúcares, mas parecem atuar exclusivamente como transdutoras de sinal. Estas proteínas foram denominadas EI^{Ntr}, NPr e EIIA^{Ntr} uma vez que os genes que codificam para as duas últimas proteínas estão no mesmo operon do gene *rpoN* que codifica para o fator σ^{54} , o qual regula a expressão de vários operons envolvidos no metabolismo de nitrogênio (REIZER et al. 1992; RABUS et al. 1999). Apesar do papel regulatório do PTS^{Ntr} ainda não estar esclarecido, foi sugerido que a fosforilação de proteínas envolvendo NPr e EIIA^{Ntr} funciona como uma ligação entre o metabolismo de carbono e nitrogênio (REIZER et al. 1992; RABUS et al. 1999).

A reação de formação de glutamato a partir de 2-oxoglutarato também é um ponto de ligação entre o metabolismo de carbono e nitrogênio. O glutamato serve como doador de grupo amino para a síntese de aminoácidos e nucleotídeos, enquanto o 2-oxoglutarato é um dos principais intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. A conexão entre estes intermediários é feita através de uma família de proteínas transdutoras de sinal, a família PII (COMMICHAU et al. 2006). As proteínas do tipo PII ligam 2-oxoglutarato e ATP e ainda podem ser modificadas covalentemente em resposta aos níveis de glutamina. Desta forma, as proteínas PII integram os sinais de carbono, energia e nitrogênio e em resposta a estes sinais, interagem com vários receptores envolvidos no controle do metabolismo de nitrogênio (NINFA & ATKINSON, 2000).

1.2. PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII

A família PII é composta por um grupo de proteínas transdutoras de sinal amplamente distribuídas entre os taxa, sendo encontradas em Bacteria, Archaea e Eukarya (ARCONDÉGUY et al. 2001). Nas enterobactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (filo Proteobacteria, classe γ -Proteobacteria) dois genes que codificam para proteínas do tipo PII foram identificados, *glnB* e *glnK* (SON & RHEE, 1987; HOLTEL & MERRICK, 1988; van HEESWIJK et al. 1996; JACK et al. 1999). O gene *glnB*, que codifica para a proteína GlnB, é monocistrônico e expresso constitutivamente. O gene *glnK* (proteína GlnK) forma um operon com o gene *amtB*,

que codifica para um transportador de amônio (*AmtB*) e é transcrito apenas em condições limitantes de nitrogênio. Outras γ -proteobactérias também possuem os genes *glnB* e *glnK* na mesma organização que *E. coli* (THOMAS et al. 2000), mas algumas exceções também foram observadas. *Azotobacter vinelandii* possui apenas um gene que codifica para uma proteína do tipo PII, o gene *glnK*, que também é co-transcrito com o gene *amtB* a partir de um promotor do tipo σ^{70} (MELETZUS et al. 1998). *Xylella fastidiosa* também possui apenas um gene que codifica para PII, localizado entre os genes *glnA* (glutamina sintetase) e *amtB*. Uma organização similar foi observada em *Xanthomonas citri* (ARCONDÉGUY et al. 2001).

Entre os organismos da classe α -Proteobacteria, gêneros como *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* e *Rhodobacter* possuem dois genes que codificam para proteínas do tipo PII (ARCONDÉGUY et al. 2001). Um dos genes codifica para *GlnB* e é co-transcrito com o gene *glnA* (glutamina sintetase), o outro gene codifica para *GlnK* e é ligado ao gene *amtB*. Em *Azospirillum brasilense* também existem dois genes que codificam para PII, o gene *glnB*, que está ligado a *glnA*, e o segundo gene, que não está ligado a *amtB*, denominado de *glnZ* (de ZAMAROCZY et al. 1993; de ZAMAROCZY et al. 1996). Já em *Rhodospirillum rubrum*, além das proteínas *GlnB* e *GlnK* foi encontrada uma terceira proteína PII denominada *GlnJ* (ZHANG et al. 2001). *Gluconacetobacter diazotrophicus* também possui 3 proteínas do tipo PII, codificadas a partir de um operon *glnBglnA* e dois operons *glnKamtB* (PERLOVA et al. 2003). *Rhodopseudomonas palustris* também possui três genes que codificam para proteínas do tipo PII, que codificam para *GlnB*, *GlnK1* e *GlnK2* (CONNELLY et al. 2006). A regulação da transcrição do operon *glnBglnA* varia entre α -proteobactérias e a expressão de *GlnK*, nos organismos em que foi estudada, ocorre a partir de um promotor dependente de σ^{54} (ARCONDÉGUY et al. 2001).

Entre os membros da classe β -Proteobacteria, *Azoarcus* sp. e *Herbaspirillum seropedicae* são os mais estudados. *Azoarcus* sp. possui três genes que codificam para PII, sendo um homólogo a *glnB* (proteína *GlnB*) e dois homólogos a *glnK*, que codificam para as proteínas *GlnK* e *GlnY*. Cada homólogo de *glnK* está ligado a um homólogo de *amtB* (*glnK* ligado a *amtB* e *glnY* ligado a *amtY*) e estes operons são transcritos preferencialmente em condições limitantes de nitrogênio (MARTIN et al. 2000). O diazotrofo *H. seropedicae*, apresenta dois genes que codificam para

proteínas PII organizados de maneira similar a *E. coli*. O gene *glnB* de *H. seropedicae* é monocistrônico e expresso constitutivamente a partir de um promotor do tipo σ^{70} (BENEILLI, 1997). O gene *glnK* faz parte do operon *orf1glnKamtB*, expresso a partir de um promotor do tipo σ^{54} , sendo que a *orf1* codifica para uma provável proteína periplasmática de função desconhecida (NOINDORF et al. 2006).

Entre os membros do filo Firmicutes, *Bacillus subtilis* possui apenas um gene que codifica para PII, originalmente designado de *nrgB* que é co-transcrito com um gene homólogo a *amtB* denominado *nrgA* (WRAY et al. 1994). Atualmente este operon é designado como *amtBglnK*. A mesma organização é observada em *Streptococcus mutans* (AJDIC et al. 2002; PORTUGAL, 2006). Nos organismos do filo Actinobacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* e *Corynebacterium glutamicum* o gene *glnK* é co-transcrito com genes homólogos ao *amtB* e ao *glnD*, formando o operon *amtBglnKglnD* (COLE et al. 1998; JAKOBY et al. 1999; FINK et al. 2002).

O gene *glnK* (inicialmente denominado *glnB*) foi identificado em várias espécies do filo Cyanobacteria: *Synechococcus* sp. estirpe PCC7942, *Synechocystis* sp. estirpe PCC6803, *Calothrix* sp. estirpe PCC7601, *Pseudanabaena* sp. estirpe PCC6901, *Microcystis* sp. estirpe PCC7813, *Nostoc* sp. estirpe PCC8009 e *Prochlorococcus marinus* estirpe PCC9511 levando autores a sugerirem que o gene *glnK* deve estar presente em todas as cianobactérias (TSINOREMAS et al. 1991; ARCONDÉGUY et al. 2001; PALINSKA et al. 2002). Nos organismos onde foi estudado, *Synechococcus* sp. estirpe PCC7942, *Synechocystis* sp. estirpe PCC6803, *Nostoc punctiforme* e *Anabaena* sp. estirpe PCC7120, o gene *glnK* parece ser monocistrônico e seu nível de transcrição responde aos níveis de nitrogênio (TSINOREMAS et al. 1991; GARCIA-DOMINGUEZ & FLORENCIO, 1997; HANSON et al. 1998; GONZALEZ et al. 2000).

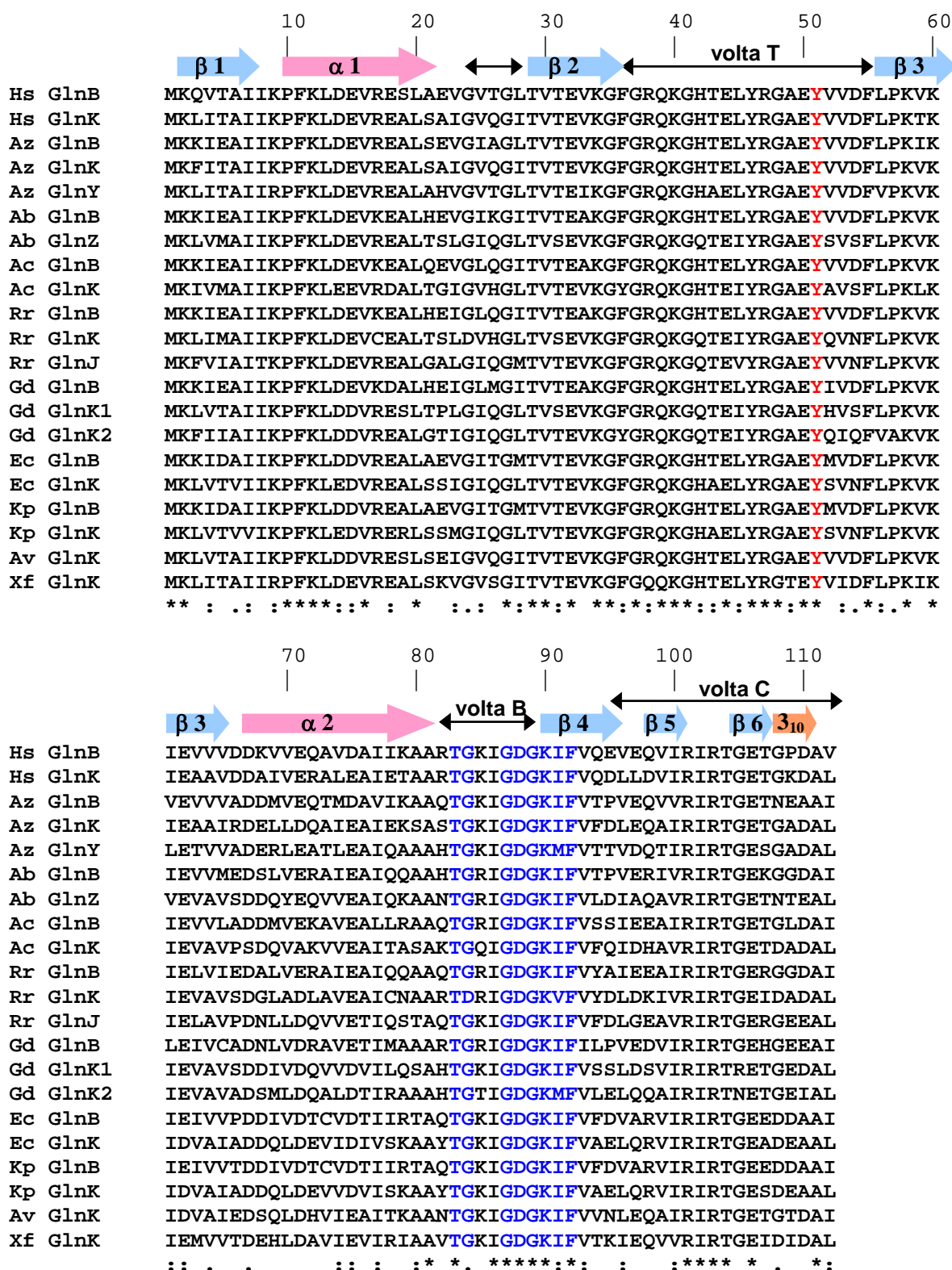
Em Archaea, os genes que codificam para proteínas do tipo PII que foram identificados aparecem ligados a homólogos de *amtB* e geralmente estão presentes em cópias múltiplas (THOMAS et al. 2000). Em alguns metanógenos diazotrofos duas cópias adicionais de genes que codificam para proteínas PII, denominados *nifl*₁ e *nifl*₂, também são encontrados. Estas cópias normalmente estão localizadas entre os genes *nifH* e *nifD* (ARCONDÉGUY et al. 2001).

As proteínas PII também foram encontradas em algumas plantas. Um gene homólogo a *glnB* foi identificado no genoma do cloroplasto das algas *Porphyra purpurea* e *Cyanidium caldarium*. Posteriormente, genes que codificam para proteínas do tipo PII foram identificados nas plantas superiores *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis* (mamona), *Lycopersicon esculentum* (tomate) e *Glycine max* (soja) (ARCONDÉGUY et al. 2001). Em *Arabidopsis thaliana* o gene *GLB1* que codifica para PII é transcrito a partir do genoma nuclear e a proteína é transportada para o cloroplasto (HSIEH et al. 1998). A transcrição do RNAm de *GLB1* é induzida pela luz e por sacarose e reprimida pela presença dos aminoácidos asparagina, glutamina e glutamato (HSIEH et al. 1998).

1.3. ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS PII

As proteínas da família PII de proteobactérias apresentam uma alta homologia na sequência de aminoácidos (Figura 1). A estrutura tridimensional de algumas destas proteínas já foi determinada por difração de raios-X e os modelos estruturais obtidos também são similares. O modelo estrutural da proteína GlnB de *E. coli* mostra que esta proteína é um homotrímero e cada monômero é formado por duas α -hélices e seis folhas β -pregueadas (Figura 2) (CHEAH et al. 1994; CARR et al. 1996). As duas α -hélices e as folhas β -pregueadas 1 a 4 formam um duplo motivo $\beta\alpha\beta$. Este motivo é conectado por uma volta que abrange os resíduos 37-55, denominada de volta T, na qual se localiza o resíduo Tyr 51, sítio de modificação pós-traducional desta proteína. A volta B (resíduos 82-88) separa a segunda α -hélice da quarta folha β , e a volta C, que contém as folhas β -pregueadas 5 e 6 (resíduos 102-105) é encontrada na região C-terminal. Na estrutura do trímero, o posicionamento dos monômeros forma três cavidades laterais, formadas pelas voltas B e T de um monômero e a volta C do monômero adjacente. As folhas β -pregueadas estão voltadas para o interior da molécula formando uma cavidade central e as α -hélices para a face externa da molécula.

FIGURA 1 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae* E PROTEÍNAS PII DE OUTRAS PROTEOBACTÉRIAS

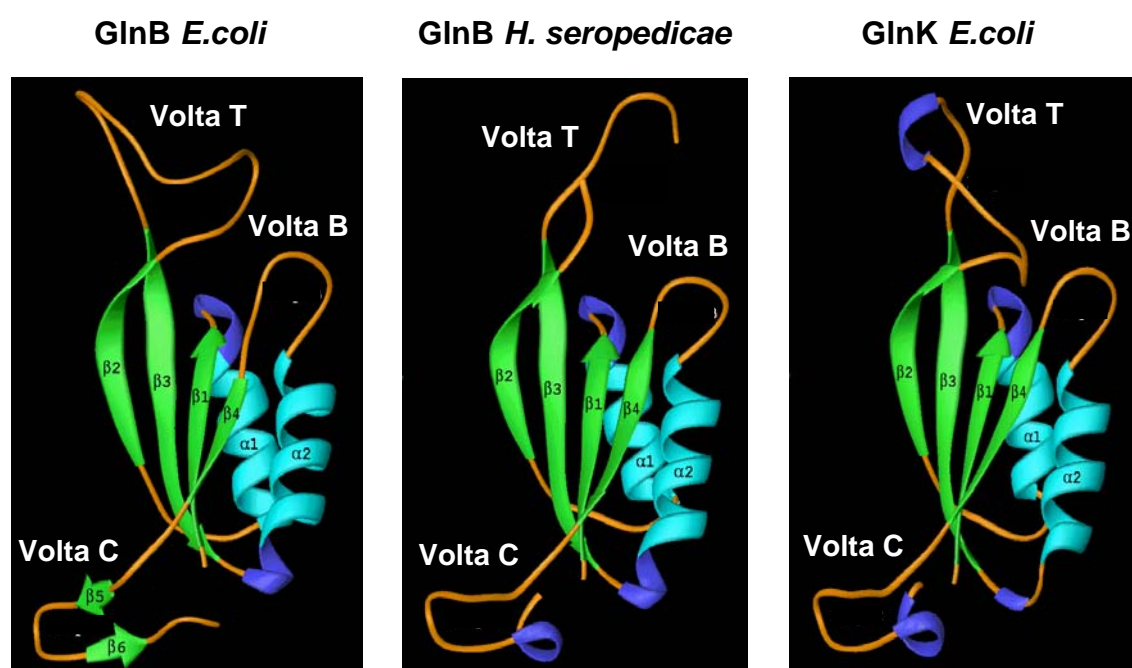


O alinhamento das sequências de aminoácidos foi realizado com o programa ClustalW (THOMPSON et al. 1994) utilizando as sequências de proteínas PII dos seguintes organismos: *H. seropedicae* (Hs), *Azoarcus* sp. estirpe BH72 (Az), *Azospirillum brasilense* (Ab), *Azorhizobium caulinodans* (Ac), *Rhodospirillum rubrum* (Rr), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd), *Escherichia coli* (Ec), *Klebsiella pneumoniae* (Kp), *Azotobacter vinelandii* (Av) e *Xylella fastidiosa* (Xf). Os símbolos abaixo das sequências representam: (*) resíduo idêntico em todas as sequências, (:) substituição conservada, (.) substituição semi-conservada. Em destaque são mostrados o resíduo Tyr 51 (vermelho) e os resíduos que fazem parte do sítio de ligação ao ATP (azul). As estruturas secundárias e as regiões das voltas B, T e C indicadas na figura são aquelas observadas no modelo estrutural da proteína GlnB de *H. seropedicae*.

A proteína GlnK também forma um trímero, com a estrutura do núcleo similar à da proteína GlnB (XU et al. 1998). Na volta T, nos resíduos 47 a 49, a proteína GlnK contém uma hélice 3_{10} que é ausente na proteína GlnB de *E. coli*. A volta C da proteína GlnK contém apenas uma folha β -pregueada e uma volta de uma hélice 3_{10} que não é observada em GlnB (Figura 2). No trímero, a hélice 3_{10} da região C-terminal de cada monômero localiza-se na superfície das cavidades laterais (XU et al. 1998).

A estrutura dos complexos GlnB-ATP e GlnK-ATP de *E. coli* mostra que as moléculas de ATP ligam-se às cavidades laterais formadas entre as subunidades do trímero das proteínas PII (XU et al. 1998; XU et al. 2001). Cada molécula de ATP interage com resíduos da volta C de uma subunidade e resíduos da volta B da subunidade adjacente. Os resíduos que fazem parte do sítio de ligação de ATP são altamente conservados nas proteínas PII (Figura 1) (XU et al. 1998). As proteínas GlnB e GlnK ligam a base nitrogenada e o açúcar do ATP de forma similar, mas interagem de maneira diferente com os fosfatos (XU et al. 1998; XU et al. 2001).

FIGURA 2 – MODELO ESTRUTURAL DOS MONÔMEROS DAS PROTEÍNAS GlnB DE *H. seropedicae* E GlnB E GlnK DE *E. coli*



As figuras com os monômeros das proteínas PII foram adaptadas de CARR et al. (1996) (GlnB de *E. coli*), XU et al. (1998) (GlnK de *E. coli*) e BENELLI et al. (2002b) (GlnB de *H. seropedicae*).

O modelo estrutural da proteína GlnB de *H. seropedicae* mostra que o monômero desta proteína apresenta um duplo motivo $\beta\alpha\beta$ similar ao encontrado na proteína GlnB de *E. coli* (Figura 2) (BENELLI et al. 2002b). A estrutura do trímero da proteína GlnB de *H. seropedicae* também é similar à de *E. coli* onde as folhas β -pregueadas estão voltadas para o centro do trímero, formando uma cavidade central, e as α -hélices para a superfície da molécula (Figura 3). Em contraste com a proteína GlnB de *E. coli*, que apresenta na região C-terminal uma folha β -pregueada, a proteína GlnB de *H. seropedicae* apresenta nesta região uma volta de uma hélice 3_{10} , como observada para a proteína GlnK de *E. coli* nativa e GlnK e GlnB de *E. coli* ligadas a ATP. Além disso, a cavidade lateral formada na interface de cada monômero da proteína GlnB de *H. seropedicae* é similar àquela observada na GlnK de *E. coli* mas menor que a da GlnB de *E. coli*. As densidades eletrônicas correspondentes aos resíduos 38 a 53, que fazem parte da volta T, não foram visualizadas em nenhum dos monômeros devido a alta mobilidade desta região nos sistemas cristalinos obtidos. Estudos *in silico* sugerem que além do sítio de ligação ao ATP, o sítio de ligação ao 2-oxoglutarato também está localizado na cavidade lateral e estes sítios não se sobrepõem (BENELLI et al. 2002b).

1.4. MODIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII EM RESPOSTA A MUDANÇAS FISIOLÓGICAS

As proteínas PII podem ser covalentemente modificadas em resposta a mudanças do meio como níveis de nitrogênio, carbono e luz. A primeira modificação estudada foi a uridililação do resíduo Tyr 51 da proteína GlnB de *E. coli* em resposta aos níveis de nitrogênio. Este resíduo é altamente conservado entre as proteínas as PII de proteobactérias e actinobactérias (ARCONDÉGUY et al. 2001). Enquanto em proteobactérias Tyr 51 é o sítio de uridililação, nas actinobactérias *Streptomyces coelicolor* e *Corynebacterium glutamicum* este resíduo é sítio de adenililação. Por outro lado, nas cianobactérias as proteínas PII são fosforiladas no resíduo Ser 49. Em organismos dos domínios Archaea e Eukarya as possíveis modificações de PII ainda não foram estudadas.

FIGURA 3 – MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GlnB DE *Herbaspirillum seropedicae*



Estrutura do trímero da proteína GlnB de *H. seropedicae*: 1, cavidade central; 2, cavidade lateral. Adaptada de BENELLI et al. (2002b).

1.4.1. Uridililação das Proteínas PII

A uridililação das proteínas PII foi observada em *E. coli* (ADLER et al. 1975; FRANCIS & ENGLEMAN, 1978; KAMBEROV et al. 1994a; ATKINSON & NINFA, 1999), *K. pneumoniae* (EDWARDS & MERRICK, 1995), *Rhizobium leguminosarum* (COLONNA-ROMANO et al. 1993), *Azospirillum brasilense* (de ZAMAROCZY et al. 1996; ARAUJO et al. 2004), *Azotobacter vinelandii* (RUDNICK et al. 1998), *Azoarcus* sp. estirpe BH72 (MARTIN et al. 2000), *H. seropedicae* (BENELLI et al. 2001), *R. palustris* (CONNELLY et al. 2006) e ainda sugerida em outras bactérias. Em *E. coli*, na presença de baixos níveis de glutamina, a enzima GlnD tem atividade de uridilil transferase e transfere um grupo UMP, a partir de um UTP, para as proteínas GlnB e GlnK (reação de uridililação) (SON & RHEE, 1987; ATKINSON & NINFA, 1999). Quando os níveis de glutamina estão altos, GlnD tem atividade removedora de uridilil e retira os grupos UMP das proteínas PII (desuridililação) (KAMBEROV et al. 1994a; ATKINSON & NINFA, 1999). O estado de uridililação das proteínas PII é regulado principalmente pelos níveis de glutamina, sugerindo que a enzima GlnD funciona como um sensor dos níveis de nitrogênio intracelular (JIANG et al. 1998a). Em *Azoarcus* sp. estirpe BH72, a modificação das proteínas GlnB e GlnK responde aos níveis de amônio, já a proteína GlnY é encontrada apenas na forma uridililada (MARTIN et al. 2000).

As reações de uridililação e desuridililação das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* requerem a presença dos efetores ATP e 2-oxoglutarato (KAMBEROV et al. 1994a; KAMBEROV et al. 1995; JIANG et al. 1998a; ATKINSON & NINFA, 1999). O sítio de uridililação das proteínas PII é o resíduo Tyr 51, localizado na volta T de cada monômero (SON & RHEE, 1987). Em sua forma trimérica, as proteínas PII possuem três sítios de uridililação podendo ser encontradas na forma não modificada ou ligada a uma, duas ou três moléculas de UMP (mono-uridililada PII-(UMP)₁, di-uridililada PII-(UMP)₂ ou tri-uridililada PII-(UMP)₃).

O gene *glnD* foi identificado em diversos organismos incluindo gêneros dos domínios Bacteria e Archaea (ARCONDÉGUY et al. 2001). Em *E. coli*, o gene *glnD* é monocistrônico e apresenta baixos níveis de expressão (KAMBEROV et al. 1994a; KIM et al. 1998). Em vários organismos a proteína GlnD apresenta um motivo nucleotidiltransferase conservado localizado na região N-terminal (HOLM &

SANDER, 1995). Este motivo provavelmente localiza-se no sítio ativo da enzima, sugerindo que as duas atividades de GlnD encontram-se no mesmo sítio.

O mecanismo de uridililação das proteínas GlnB foi melhor estudado em *E. coli*, onde as proteínas GlnB e GlnD purificadas foram utilizadas para avaliar os parâmetros cinéticos da reação *in vitro* (ATKINSON et al. 1994; JIANG et al. 1998a). Nestas condições, a reação de uridililação da proteína GlnB é não-cooperativa (ATKINSON et al. 1994). A reação ocorre por um mecanismo sequencial ordenado, onde a enzima GlnD liga primeiro a proteína GlnB e em seguida o segundo substrato, UTP. Após a reação são liberados os produtos PPI e GlnB-UMP, nesta ordem (JIANG et al. 1998a). A uridililação da proteína GlnB de *E. coli* parece ser específica para o nucleotídeo UTP (JIANG et al. 1998a). Em ensaios *in vitro*, quando apenas um nucleotídeo é adicionado ao sistema de reação, ATP é o único capaz de modificar GlnB. Na presença de ATP, qualquer outro nucleotídeo (CTP, GTP e UTP) serve como substrato para GlnD. No entanto, o K_M determinado para o UTP é menor do que o K_M encontrado para cada um dos outros nucleotídeos. Além disso, quando os quatro nucleotídeos são adicionados simultaneamente em concentrações aproximadas às observadas *in vivo*, mais de 94% do produto formado é GlnB-UMP (JIANG et al. 1998a).

A reação de uridililação sofre inibição por ambos os produtos, sendo que GlnB-UMP é um inibidor competitivo em relação a GlnB, de forma que GlnB e GlnB-UMP competem pelo mesmo sítio na enzima. O estado de uridililação da proteína GlnB é controlado principalmente pela concentração de glutamina. A glutamina, molécula sinalizadora dos níveis de nitrogênio, é um inibidor incompetitivo da uridililação de GlnB e parece ligar-se ao centro do complexo GlnB-GlnD (ATKINSON et al. 1994; JIANG et al. 1998a).

A enzima GlnD também cataliza a reação de desuridililação das proteínas PII promovendo a hidrólise de PII-UMP em PII e UMP (ADLER et al. 1975). Na presença de pirofosfato a enzima catalisa a formação de ambos UMP e UTP a partir de GlnB-UMP. Nos ensaios *in vitro*, a enzima GlnD de *E. coli* apresenta atividade tanto na presença do íon Mg^{2+} como do íon Mn^{2+} , sendo que a atividade de uridilil transferase é maior na presença de Mg^{2+} enquanto a desuridililação é mais eficiente na presença de Mn^{2+} . No entanto, o íon Mg^{2+} parece ser o cofator utilizado por GlnD *in vivo* (JIANG et al. 1998a). A taxa de uridililação da proteína GlnK de *E. coli in vitro* foi

similar à taxa de GlnB, no entanto, a taxa de desuridililação de GlnK-UMP foi cerca de dez vezes menor que a de GlnB-UMP (ATKINSON & NINFA, 1999).

A proteína GlnB de *H. seropedicae* foi uridililada *in vitro* pelo extrato livre de células de *H. seropedicae* e pela proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada (BENELLI et al. 2001). Nestas condições, a uridililação de GlnB ocorreu na presença de ATP ou de 2-oxoglutarato, sendo mais eficiente na presença de ambos. A desuridililação de GlnB-UMP ocorreu apenas na presença de glutamina e foi inibida por ATP e 2-oxoglutarato (BENELLI et al. 2001).

1.4.2. Adenililação das Proteínas PII

A modificação de uma proteína PII através da adição de um grupo adenilil foi observada pela primeira vez em *Streptomyces coelicolor* (HESKETH et al. 2002). Estudos da regulação pós-traducional de GlnK indicaram que esta proteína pode ser modificada de maneira reversível ou irreversível em resposta aos níveis de nitrogênio. Em baixas concentrações de nitrogênio e quando as células estão entrando em estado estacionário, GlnK é modificada irreversivelmente pela remoção dos três primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal. A modificação reversível ocorre via proteína GlnD, que em condições limitantes de nitrogênio, adenilila a proteína GlnK no resíduo Tyr 51, o mesmo resíduo que é sítio de uridililação em proteobactérias (HESKETH et al. 2002).

A adenililação de GlnK também foi observada em *Corynebacterium glutamicum* (STRÖSSER et al. 2004). Neste organismo a proteína GlnD adenilila GlnK em baixos níveis de nitrogênio e desadenilila GlnK-AMP quando estes níveis aumentam. A atividade de adenililação localiza-se na região N-terminal da proteína GlnD, enquanto a atividade de remoção de adenilil depende da região C-terminal (STRÖSSER et al. 2004). Esta característica observada em *C. glutamicum* difere da proteína GlnD de *E. coli*, em que as atividades de uridililação e remoção de uridilil encontram-se no mesmo sítio ativo (JIANG et al. 1998a).

1.4.3. Fosforilação das Proteínas PII

A fosforilação de proteínas PII foi observada nas cianobactérias *Synechococcus* sp. estirpe PCC7942 (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1994), *Synechococcus* sp. estirpe PCC6301 (HARRISON et al. 1990), *Synechocystis* sp. estirpe PCC6803 (HISBERGUES et al. 1999), *Calothrix* sp. PCC7504 (LIOTENBERG et al. 1996) e *Anabaena* sp. estirpe PCC7120 (ZHANG & LIBS, 1998). A modificação de GlnK nestes organismos não é controlada por uma enzima bifuncional como GlnD, mas por duas enzimas distintas, uma quinase, que ainda não foi caracterizada, e a fosfatase PphA (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1995b; IRMLER et al. 1997; IRMLER & FORCHHAMMER, 2001). Na ausência de qualquer fonte de nitrogênio, GlnK está sempre fosforilada, enquanto que na presença de amônio, a proteína GlnK é desfosforilada. Na presença de nitrato, o grau de fosforilação depende do suprimento de CO₂ e das condições de luz. Desta forma, a proteína GlnK parece estar envolvida no controle do metabolismo de carbono e de nitrogênio em *Synechococcus* sp. (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1994; FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1995a). Além disso, os efetores ATP e 2-oxoglutarato estimulam a fosforilação e inibem a desfosforilação, sugerindo que a ligação destes efetores a GlnK afeta inversamente seu reconhecimento pela quinase e pela fosfatase (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1995b; FORCHHAMMER & HEDLER, 1997; IRMLER et al. 1997).

Em *Synechococcus* sp. um gene homólogo a *glnD* não foi detectado. Entretanto, a proteína GlnK de *Synechococcus* sp. estirpe PCC7942 é uridililada *in vivo* pela proteína GlnD de *E. coli*, embora com baixa eficiência (FORCHHAMMER & HEDLER, 1997). A expressão da proteína GlnK de *Synechococcus* sp. em *E. coli* leva à inativação das proteínas GlnB e GlnK deste organismo. Este efeito é causado pela formação de heterotrímeros funcionalmente inativos entre os produtos dos genes *glnK* de *Synechococcus* sp. e *glnB* e *glnK* de *E. coli* (FORCHHAMMER et al. 1999).

1.5. INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII COM MOLÉCULAS EFETORAS

A interação das proteínas PII com seus alvos depende dos níveis de nitrogênio, carbono e energia na célula, os quais são sinalizados pelas concentrações intracelulares de glutamina, 2-oxoglutarato e ATP (ARCONDÉGUY et al. 2001). Os níveis de glutamina controlam o estado de uridililação de PII através da enzima GlnD. As moléculas 2-oxoglutarato e ATP também são essenciais para as reações de uridililação e desuridililação, mas estes efetores ligam-se diretamente aos substratos PII e PII-UMP e não à proteína GlnD (KAMBEROV et al. 1995; JIANG et al. 1998a). As proteínas PII apresentam três sítios de ligação para ATP e três para 2-oxoglutarato, cada sítio localizado em um monômero. A ligação de 2-oxoglutarato a GlnB é dependente da presença de ATP, enquanto que a ligação de ATP também é estimulada pela presença de 2-oxoglutarato (KAMBEROV et al. 1995).

Em *E. coli*, a ocupação dos três sítios de ligação de 2-oxoglutarato da proteína GlnB não ocorre de forma independente (KAMBEROV et al. 1995; JIANG et al. 1998c). A primeira molécula de 2-oxoglutarato liga-se à proteína GlnB mesmo em concentrações muito baixas (aproximadamente 5 μ M), sugerindo que *in vivo* um dos sítios encontra-se permanentemente ocupado, já que a concentração intracelular de 2-oxoglutarato é de 0,1 a 0,9 mM (SENIOR, 1975; KAMBEROV et al. 1995; JIANG et al. 1998a). A ligação de duas outras moléculas de 2-oxoglutarato à proteína GlnB ocorre apenas em altas concentrações, de forma que a ligação da primeira molécula de 2-oxoglutarato a GlnB exerce uma cooperatividade negativa na ligação das moléculas adicionais (JIANG et al. 1998a; JIANG et al. 1998b; JIANG et al. 1998c). A capacidade de interação da proteína GlnB com alguns de seus alvos é influenciada pelo número de moléculas de 2-oxoglutarato ligadas (KAMBEROV et al. 1995; LIU & MAGASANIK, 1995; JIANG et al. 1998a; JIANG et al. 1998b; JIANG et al. 1998c). Esta regulação alostérica também foi observada para a proteína GlnK de *E. coli* (ATKINSON & NINFA, 1999).

Além do ATP, a molécula de ADP também parece influenciar nas funções das proteínas PII. A determinação da estrutura tridimensional do complexo GlnK-AmtB de *E. coli*, mostrou a presença de ADP e não ATP ligado à GlnK. CONROY et al. (2007) purificaram o complexo GlnK-AmtB enquanto GRUSWITZ et al. (2007) purificaram as proteínas separadas e combinaram as proteínas na presença de ATP

antes da cristalização. Ambos os grupos admitem que o ADP identificado nos cristais pode ter sido originado da hidrólise do ATP durante o processo de cristalização. No entanto, os autores dos dois trabalhos não descartam a hipótese de que o ADP estivesse ligado à proteína GlnK desde a formação do complexo.

Em *Synechococcus elongatus*, a formação do complexo entre as proteínas GlnK e NAGK (*N*-Acetil-L-glutamato quinase) é afetada tanto por ADP como por ATP (MAHESWARAN et al. 2004). ADP inibe a formação do complexo enquanto ATP atua como inibidor apenas na ausência de cátions divalentes ou na presença de íons Mg^{2+} , em conjunto com altas concentrações de 2-oxoglutarato. As moléculas ADP e ATP exercem efeito sobre a formação do complexo através da ligação à proteína GlnK (MAHESWARAN et al. 2004).

1.6. FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS PII NO SISTEMA NTR

Em muitas bactérias gram-negativas o metabolismo do nitrogênio é controlado pela cascata regulatória do sistema NTR. Neste sistema, as proteínas PII exercem um papel central como transdutoras de sinal. Em enterobactérias o sistema *ntr* é composto por sete proteínas: o sistema de dois componentes NtrB-NtrC (produtos dos genes *ntrB* e *ntrC*), as proteínas do tipo PII, GlnB e GlnK (produtos dos genes *glnB* e *glnK*), as enzimas bifuncionais GlnD e GlnE (produtos dos genes *glnD* e *glnE*) e a enzima glutamina sintetase (GS) (produto do gene *glnA*). A proteína AmtB (produto do gene *amtB*) também tem sido considerada como integrante do sistema *ntr* de *E. coli* (JAVELLE & MERRICK, 2005).

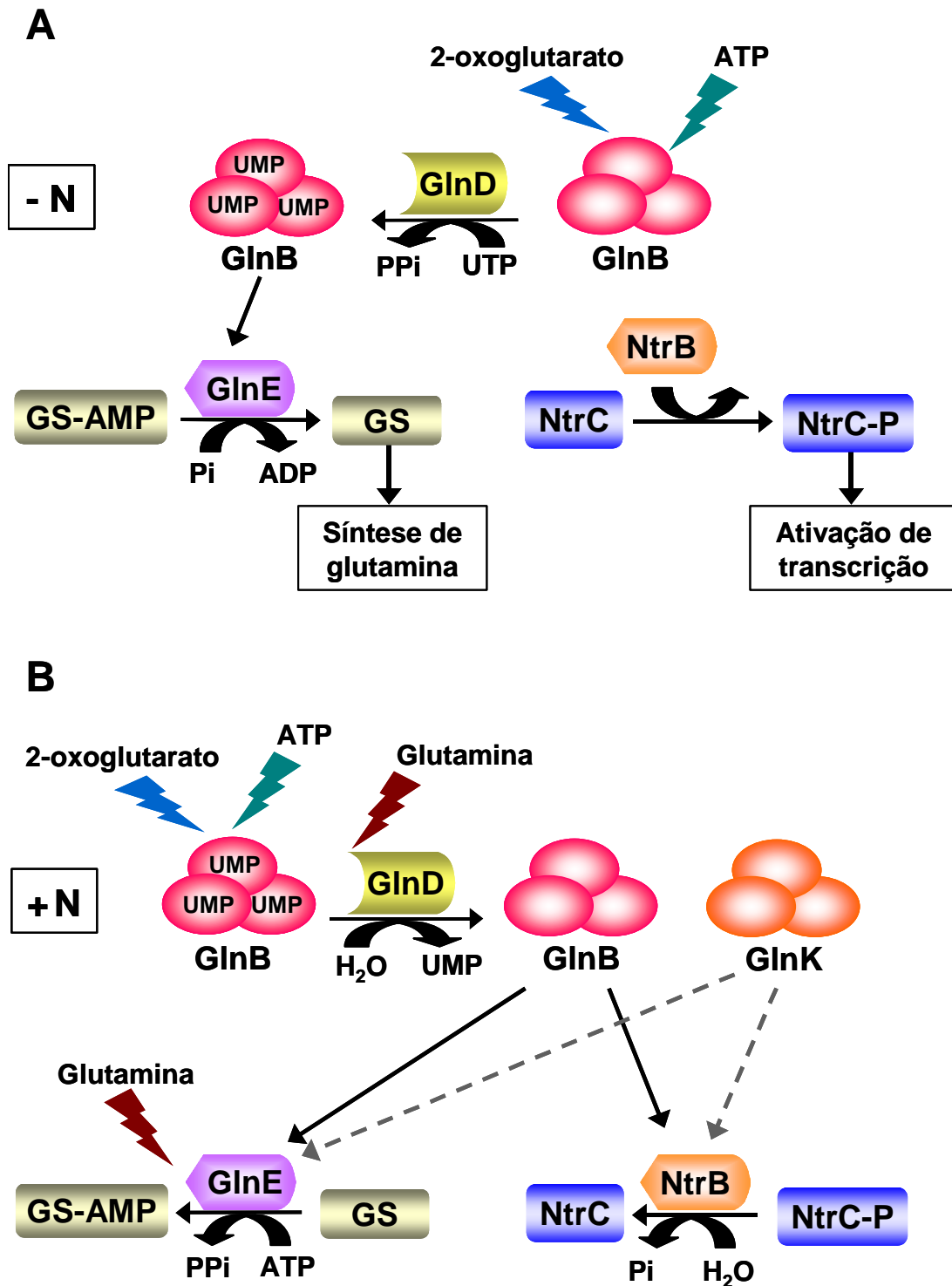
Em enterobactérias, os genes que codificam para as proteínas glutamina sintetase, NtrB e NtrC fazem parte de um único operon, *glnAntrBC* (PAHEL et al. 1982; ALVAREZ-MORALES et al. 1984; KRAJEWSKA-GRYNKIEWICZ & KUSTU, 1984). A proteína NtrC, cuja atividade é controlada pela proteína NtrB, é um ativador transcricional de promotores dependentes do fator σ^{54} da RNA polimerase (KUSTU et al. 1989; MORETT & SEGOVIA, 1993). A atividade da proteína NtrB é controlada pela proteína GlnB, que também interage com as proteínas GlnD e GlnE (ADLER et al. 1975; ENGLEMAN & FRANCIS, 1978; KAMBEROV et al. 1994a; KAMBEROV et al. 1994b; ATKINSON et al. 1994).

O sistema NTR foi bem caracterizado em *E. coli* e *K. pneumoniae*. Nestes organismos, quando os níveis de amônio intracelular estão baixos, a proteína GlnD tem atividade de uridililtransferase e transfere um grupo uridilil para o resíduo Tyr 51 de um dos monômeros da proteína GlnB (reação de uridililação) (SON & RHEE, 1987). GlnB-UMP não interage com a proteína NtrB, que na forma livre tem atividade de quinase e catalisa sua autofosforilação no resíduo His 139 (WEISS & MAGASANIK, 1988). Este grupamento fosforil é transferido para o resíduo Asp 54 do domínio N-terminal da proteína NtrC (SANDERS et al. 1992; KLOSE et al. 1993). Na forma fosforilada, NtrC-P ativa a transcrição de genes envolvidos com o metabolismo de nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995) (Figura 4).

Quando os níveis de glutamina sobem, reflexo do aumento de NH_4^+ intracelular e da atividade da glutamina sintetase, a proteína GlnD tem atividade removedora de uridilil e desuridilila GlnB (KAMBEROV et al. 1994a). A proteína GlnB na forma não uridililada, é capaz de interagir com a proteína NtrB, estimulando sua atividade de fosfatase. Nessa forma, NtrB catalisa a desfosforilação da proteína NtrC-P, inativando-a (NINFA & MAGASANIK, 1986). A proteína NtrC desfosforilada é incapaz de ativar a transcrição dos genes envolvidos no metabolismo alternativo de nitrogênio (Figura 4).

O estado de uridililação de GlnB também interfere no controle da atividade de GS. Em condições de excesso de amônio, GS é inativada por adenililação. Este processo é catalisado pelo domínio C-terminal da proteína GlnE (atividade de adenililtransferase) em presença de GlnB não uridililada e glutamina (STADTMAN et al. 1970; JAGGI et al. 1997). O estado de uridililação de GlnB é detectado pelo domínio N-terminal de GlnE, que sofre uma mudança conformacional e controla a atividade de adenililtransferase do domínio C-terminal desta enzima (JAGGI et al. 1997). Em níveis baixos de amônio, o domínio N-terminal de GlnE, em presença de GlnB-UMP, tem atividade de enzima removedora de adenilil e catalisa a desadenililação de GS, ativando-a. Esta reação requer ATP e 2-oxoglutarato (STADTMAN et al. 1970; RHEE et al. 1985; JAGGI et al. 1997).

FIGURA 4 – CASCATA REGULADORA DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO DE *Escherichia coli*



A, Em condições limitantes de glutamina a proteína GlnB é uridililada pela proteína GlnD. GlnB-UMP estimula a desadenililação da GS pela proteína GlnE e não é capaz de interagir com NtrB que fosforila NtrC. Nestas condições ocorre síntese de glutamina pela GS e ativação da transcrição de genes NtrC-dependentes pela proteína NtrC-P. B, Em condições de excesso de nitrogênio, GlnD desuridilila a proteína GlnB. GlnB não modificada estimula a adenililação da GS pela proteína GlnE e interage com NtrB estimulando a desfosforilação de NtrC. Nestas condições, GS-AMP e NtrC estão inativas. Esquema adaptado de JIANG et al. (1998b).

A proteína GlnK também é substrato da enzima GlnD, podendo ser uridililada ou desuridililada em resposta aos níveis de nitrogênio da célula (van HEESWIJK et al. 1996; ATKINSON & NINFA, 1999). GlnK também é capaz de interagir com NtrB e GlnE, no entanto é menos eficiente que GlnB no controle das atividades de NtrC e GS (ATKINSON & NINFA, 1998; ATKINSON & NINFA, 1999). Em *E. coli*, o mutante duplo *glnBglnK* apresenta deficiência de crescimento. Esta deficiência ocorre porque nesta estirpe, a proteína NtrC está permanentemente fosforilada, o que provoca a expressão constitutiva dos operons dependentes de NtrC-P, entre eles o gene *nac*. A proteína Nac atua como repressora da expressão do gene *serA* e sua expressão constitutiva causa uma depleção dos aminoácidos serina e glicina (BLAUWKAMP & NINFA, 2002a). No mutante *glnB* esta deficiência de crescimento não ocorre, sugerindo que a proteína GlnK é capaz de substituir GlnB na regulação da expressão dos genes Ntr (ATKINSON & NINFA, 1998).

Estudos *in vivo* sugerem que a proteína GlnK pode estar envolvida na regulação da expressão dos genes Ntr durante a limitação de nitrogênio em *E. coli* (BLAUWKAMP & NINFA, 2002a; BLAUWKAMP & NINFA, 2002b). Nestas condições, ambas as formas uridililada e não uridililada de GlnK estão presentes na célula (van HEESWIJK et al. 1996). Assim, a proteína GlnK não modificada pode estimular a atividade de fosfatase de NtrB, impedindo a formação dos níveis máximos de NtrC-P. Além disso, os mutantes *glnK* são menos viáveis que a estirpe selvagem após longos períodos de limitação de nitrogênio e são incapazes de recuperar o crescimento rápido quando amônio é adicionado no meio (BLAUWKAMP & NINFA, 2002b).

ATKINSON e colaboradores (2002) correlacionaram a diferença funcional com o padrão de expressão das proteínas GlnB e GlnK. A proteína GlnB é expressa

constitutivamente enquanto a expressão de GlnK é dependente de NtrC-P e ocorre apenas em condições limitantes de nitrogênio. O efeito das proteínas GlnB e GlnK expressas a partir de regiões promotoras trocadas foi avaliado em um mutante duplo *glnBglnK* de *E. coli*. Estudos sobre o controle da síntese e da atividade da glutamina sintetase nestas condições, mostraram que a proteína GlnB pode ser funcionalmente convertida a GlnK quando expressa a partir do promotor do gene *glnK*, e GlnK convertida a GlnB quando expressa constitutivamente a partir de um plasmídeo. A partir destes resultados, estes autores sugerem que os diferentes papéis de GlnB e GlnK resultam principalmente do seu padrão de expressão (ATKINSON et al. 2002).

Devido à alta similaridade entre as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*, a sua expressão simultânea *in vivo* resulta na síntese de duas espécies de heterotrímeros, GlnK/(GlnB)₂ e (GlnK)₂/GlnB, além das formas homotriméricas (van HEESWIJK et al. 2000). A eficiência de heterotrímeros obtidos *in vitro* na ativação da glutamina sintetase foi intermediária entre a dos homotrímeros (GlnK)₃ e (GlnB)₃, o que sugere que a formação destes heterotrímeros pode promover uma regulação refinada da adenililação de GS (van HEESWIJK et al. 2000).

Em *H. seropedicae*, as proteínas PII parecem não estar envolvidas no controle da atividade de GS (NOINDORF, 2006). Em mutantes *ntrB*⁻ e *ntrC*⁻ deste organismo, a atividade de GS é baixa, independentemente dos níveis de nitrogênio (PERSUHN et al. 2000). A partir destes resultados foi sugerido que a proteína GlnK, cuja expressão é dependente de NtrC, estivesse envolvida neste processo. No entanto, a atividade de GS tanto no mutante *glnB*⁻ como no mutante *glnK*⁻ foi semelhante a estirpe selvagem, sugerindo que em *H. seropedicae* apenas uma proteína do tipo PII (GlnB ou GlnK) é suficiente para o controle da atividade de GS (NOINDORF, 2006).

1.7. FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS PII NA CAPTAÇÃO DE AMÔNIO

Sob condições limitantes de nitrogênio, a captação de amônio pelas células de muitos organismos é mediada por uma classe de proteínas de membrana designadas de Amt (von WIREN e MERRICK, 2004). Essa classe de proteínas está presente em bactérias, fungos e plantas, enquanto em animais está representada pelas proteínas Rh (THOMAS et al. 2000). A proteína Amt melhor estudada é a

AmtB de *E. coli*, um homotrímero no qual cada subunidade é formada por 11 hélices transmembrana (KHADEMI et al. 2004).

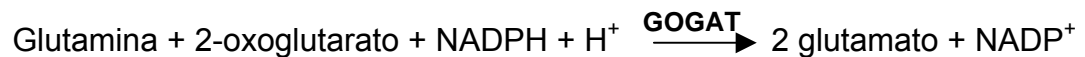
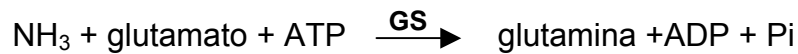
Nas bactérias onde as proteínas Amt foram identificadas, o gene *amtB* encontra-se no mesmo operon que o gene *glnK*, com poucas exceções. Esta ligação conservada entre os genes sugeriu que estas proteínas poderiam interagir (THOMAS et al. 2000). Ensaios *in vivo* indicaram que ocorre a formação de um complexo entre GlnK e AmtB em *E. coli* e esta associação é controlada pelo estado de uridililação de GlnK (COUTTS et al. 2002; JAVELLE et al. 2004). Em resposta a um aumento nos níveis de nitrogênio celular, GlnK é desuridilada e forma um complexo com AmtB interrompendo a captação de amônio, de uma forma rápida e reversível (JAVELLE et al. 2004). A co-purificação destas proteínas confirmou que AmtB e GlnK formam um complexo funcional com uma estequiometria de 1:1 (DURAND & MERRICK, 2006). A análise da estrutura tridimensional do complexo AmtB-GlnK mostrou que GlnK interage com a região C-terminal de AmtB através da volta-T de cada um dos seus monômeros. Esta interação bloqueia fisicamente a passagem de amônio pelo poro de AmtB (CONROY et al. 2007; GRUSWITZ et al. 2007).

Além de *E. coli*, o sequestro de proteínas PII por AmtB também foi mostrado em outros organismos como *Azotobacter vinelandii* (COUTTS et al. 2002) e *Azospirillum brasilense* (HUERGO et al. 2006a; HUERGO et al. 2006b).

1.8. ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS PII NO CONTROLE DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

As bactérias podem utilizar uma série de compostos como fonte de nitrogênio, desde compostos inorgânicos simples como dinitrogênio (N₂) e nitrato até compostos mais complexos incluindo aminoácidos como a histidina e a arginina ou nucleosídeos como a citidina (MERRICK & EDWARDS, 1995). Em praticamente todas as células, glutamato e glutamina são os principais doadores de nitrogênio para reações biossintéticas e a principal via de incorporação do nitrogênio nestes compostos é a glutamina sintetase/glutamato sintase (MERRICK & EDWARDS, 1995). A glutamina sintetase (GS) converte glutamato e amônio em glutamina

enquanto a glutamato sintase (GOGAT) transfere o grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato para produzir duas moléculas de glutamato (POSTGATE, 1998):



Quando os níveis de amônio no meio são insuficientes para a formação de glutamato e glutamina, o sistema NTR aciona as vias alternativas do metabolismo de nitrogênio para a obtenção de amônio. A fixação biológica de nitrogênio é uma das vias alternativas reguladas pelo sistema NTR. Este processo ocorre em vários gêneros de Bacteria e Archaea (POSTGATE, 1982) e estes microrganismos são chamados de bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotrofos. A fixação de nitrogênio consiste na redução do N₂ atmosférico a íons amônio, forma pela qual o nitrogênio pode ser assimilado via glutamina sintetase e glutamato sintase (GS/GOGAT).

A reação de redução do N₂ é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase. Esta conversão requer um mínimo de 16 mols de ATP para reduzir 1 mol de N₂ a 2 mols de amônio, o que representa um alto custo energético (POSTGATE, 1998):



Como o funcionamento da nitrogenase consome grande quantidade de energia para reduzir o nitrogênio atmosférico, tanto a síntese quanto a atividade deste complexo enzimático são reguladas.

A atividade da nitrogenase é controlada em alguns diazotrofos através de um mecanismo de inativação reversível por ADP-ribosilação da proteína NifH

(dinitrogenase redutase) (MERRICK & EDWARDS, 1995). Este controle pós-traducional já foi caracterizado em organismos como *Azospirillum brasilense*, *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum lipoferum* e *Rhodobacter capsulatus* (ZHANG et al. 1997). Duas enzimas são responsáveis por esta reação reversível, DraT e DraG (produtos dos genes *draT* e *draG*, respectivamente). Na presença de NH_4^+ , a enzima DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase) transfere uma ADP-ribose para o resíduo Arg 101 de uma subunidade da proteína NifH, resultando na inativação desta enzima. Quando os níveis de amônio diminuem, o grupo ADP-ribose é removido da proteína NifH pela enzima DraG (glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase), restaurando a atividade da nitrogenase (LUDDEN & ROBERTS, 1989; ZHANG et al. 1997).

Em muitos organismos, as proteínas PII estão envolvidas no controle da ADP ribosilação de NifH. Em *A. brasilense* GlnB e GlnZ participam deste controle interagindo diretamente com DraT e DraG (HUERGO et al. 2006b). Em condições limitantes de nitrogênio GlnZ é uridililada e interage com DraG ativando esta enzima, e conseqüentemente ativando a nitrogenase. O aumento na concentração de amônio provoca a desuridililação das proteínas PII. Nesta forma GlnB é capaz de interagir com DraT ativando-a, o que resulta na modificação da proteína NifH e inativação da nitrogenase. A desuridililação de GlnZ faz com que o complexo GlnZ-DraG seja ligado à fração de membrana pela proteína AmtB, impedindo que DraG ative a nitrogenase (HUERGO et al. 2006a, HUERGO et al. 2006b).

Em *H. seropedicae*, a inibição da atividade da nitrogenase foi avaliada na presença de diferentes compostos nitrogenados. Cloreto de amônio, glutamato e glutamina foram os compostos mais efetivos no desligamento da nitrogenase, outros compostos foram menos efetivos e a adição de histidina, lisina e arginina não afetou a atividade da nitrogenase (KLASSEN et al. 1997). Neste organismo, nenhum gene homólogo a *draT* e *draG* foi identificado (Sequenciamento do Genoma de *H. seropedicae* - Projeto Genopar), sugerindo a existência de outro mecanismo de controle da atividade de nitrogenase. O transportador de amônio AmtB parece estar envolvido neste controle (NOINFORF, 2006). Ensaios *in vivo* mostraram que quando cloreto de amônio é adicionado a culturas de *H. seropedicae* em condições de fixação de nitrogênio, a estirpe mutante *amtB⁻* não é capaz de desligar a atividade da nitrogenase completamente. Apesar deste sistema não possuir as proteínas DraT e

DraG, este resultado sugere que a proteína AmtB está envolvida no controle do desligamento da nitrogenase em *H. seropedicae* (NOINFORF, 2006).

1.9. FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS PII NO CONTROLE DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA

Apesar do complexo da nitrogenase possuir apenas 3 polipeptídeos diferentes, sua atividade depende dos produtos de muitos outros genes. Em *Klebsiella pneumoniae* foram identificados 20 genes especificamente relacionados com a fixação de nitrogênio (genes *nif*), dos quais 14 são essenciais para a produção da nitrogenase ativa (MERRICK, 1992). Além do controle da atividade do complexo da nitrogenase, a expressão dos genes *nif* também é regulada. Em organismos como *K. pneumoniae*, a expressão dos genes *nif* é regulada positivamente pela proteína NifA. A expressão do gene *nifA*, por sua vez, é regulada pela proteína NtrC, cuja atividade é controlada pelo sistema NTR (MERRICK & EDWARDS, 1995).

A proteína NifA é composta de três domínios modulares, N-terminal, central e C-terminal. O domínio N-terminal é o domínio mais variável entre as proteínas NifA de diferentes organismos e parece ser o domínio alvo para determinados sinais regulatórios (FISCHER, 1994). O domínio central possui uma alta homologia com a proteína NtrC (DRUMMOND et al. 1986) e com outras proteínas ativadoras de promotores σ^{54} dependentes (FISCHER, 1994). Esta homologia é particularmente alta nas duas regiões em potencial para ligação de ATP (DRUMMOND et al. 1986; SOUZA et al. 1991b). Os domínios N-terminal e central são ligados por uma região interdomínio denominada de “Q-linker”. O domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado que está envolvido na ligação ao DNA (LEE et al. 1993a). Embora as proteínas NifA tenham estruturas similares, o controle de sua atividade através de oxigênio e nitrogênio varia significativamente entre os organismos (REYES-RAMIREZ et al. 2001). As proteínas PII, além de regularem a expressão de NifA através do sistema NTR, também participam do controle da sua atividade.

1.9.1 Controle da Atividade de NifA em organismos da Classe γ -Proteobacteria

Nos diazotrofos da classe γ das proteobactérias como *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, a atividade da proteína NifA é controlada pela proteína NifL. A proteína NifL é uma flavoproteína composta por dois domínios ligados por um “Q-linker” (DRUMMOND & WOOTTON, 1987; WOOTTON & DRUMMOND, 1989; HILL et al. 1996; SCHMITZ, 1997). O domínio N-terminal contém um grupo prostético FAD e mostra homologia com outras proteínas sensoras de estado redox e níveis de oxigênio (BLANCO et al. 1993). O domínio C-terminal apresenta homologia com proteínas da família de histidina quinases, membros do sistema regulatório sensor de dois componentes (DRUMMOND & WOOTTON, 1987). No entanto, NifL e NifA não são fosforiladas (LEE et al. 1993b; AUSTIN et al. 1994).

Em *K. pneumoniae*, sob altas concentrações de amônio e/ou oxigênio, NifL e NifA formam um complexo (1:1) e NifL funciona como inibidor da atividade da proteína NifA (MERRICK et al. 1982; STIPS et al. 2004). Nestas condições, NifL controla a ligação de NifA ao DNA, sua atividade catalítica e possivelmente a interação com a RNA polimerase (BARRET et al. 2001). Em condições limitantes de amônio e oxigênio, o complexo NifL-NifA é desfeito. A proteína NifL é sequestrada para a membrana citoplasmática e NifA permanece no citossol na forma ativa (KLOPPROGGE et al. 2002; STIPS et al. 2004).

Os níveis de nitrogênio celular são transmitidos ao sistema NifL/NifA pela proteína GlnK. A presença de GlnK é necessária para a restauração da atividade de NifA, independente do seu estado de uridililação (HE et al. 1997; HE et al. 1998; JACK et al. 1999). Em baixas concentrações de amônio, GlnK forma um complexo ternário com NifL-NifA. Esta estrutura provavelmente é apenas transitória, e deve ser necessária para a dissociação do complexo NifL-NifA e a ativação de NifA (STIPS et al. 2004). Na ausência da proteína GlnK, a proteína NifL permanece no citossol e inibe a atividade de NifA mesmo em condições de desrepressão (KLOPPROGGE et al. 2002).

ARCONDÉGUY et al. (1999) utilizaram um sistema heterólogo para estudar o controle da atividade de NifA de *K. pneumoniae* pelas proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*. A proteína GlnB de *E. coli* superexpressa em um mutante *glnK* de *E. coli*, foi capaz de substituir GlnK no controle da inibição de NifA por NifL. Resultados de

ensaios *in vivo* indicaram que o resíduo 54 é o aminoácido que diferencia as proteínas GlnB e GlnK quanto ao controle da atividade de NifA de *K. pneumoniae* (ARCONDÉGUY et al. 2000). Além disso, a proteína GlnB com substituição dos resíduos 43 e 54 alivia a inibição de NifL sobre NifA de forma semelhante à proteína GlnK (ARCONDÉGUY et al. 2000).

Em *K. pneumoniae*, a atividade da proteína NifL além de ser controlada pelos níveis de amônio também é controlada pelos níveis de oxigênio. Estudos realizados em estirpes mutantes de *E. coli* e *K. pneumoniae* mostraram que na ausência da proteína Fnr, um regulador transcricional que responde aos níveis de oxigênio da célula, a proteína NifL inibe a atividade de NifA mesmo em condições de baixo oxigênio (GRABBE et al. 2001). No mutante *fnr* de *E. coli*, na ausência da proteína NifL, a proteína NifA apresenta atividade tanto na ausência como na presença de oxigênio. Estes resultados sugerem que sob condições limitantes de oxigênio, a proteína Fnr (sensor primário de oxigênio) ativa a transcrição de um ou mais genes, cujos produtos são necessários para reduzir o cofator FAD da proteína NifL, o que desfaz o complexo NifL-NifA, ativando a proteína NifA (GRABBE et al. 2001). Em condições limitantes de nitrogênio e na ausência de oxigênio, a proteína NifL de *K. pneumoniae* encontra-se associada à membrana citoplasmática. Ambos os sinais de nitrogênio e oxigênio são necessários para esta associação, já que na ausência das proteínas Fnr ou GlnK, a proteína NifL encontra-se no citoplasma (KLOPPROGGE et al. 2002).

Em *A. vinelandii*, diferente do que ocorre em *K. pneumoniae*, estudos *in vitro* mostraram que a proteína GlnK interage com a proteína NifL apenas na sua forma não uridililada resultando na inativação da proteína NifA (LITTLE et al. 2000; LITTLE et al. 2002). Esta interação requer a ligação de ATP e 2-oxoglutarato a GlnK. Apenas a região C-terminal da proteína NifL, a qual apresenta homologia com o domínio quinase da proteína NtrB, é suficiente para interagir com GlnK (LITTLE et al. 2002). Em condições de excesso de nitrogênio, a proteína GlnK desuridililada interage com o complexo NifL-NifA através do domínio C-terminal da proteína NifL, mantendo NifA inativa. Em condições limitantes de nitrogênio, a proteína GlnK está uridililada e é incapaz de interagir com NifL-NifA (LITTLE et al. 2000). Nestas condições, a molécula de 2-oxoglutarato liga-se ao domínio GAF da proteína NifA. Esta ligação parece induzir uma mudança conformacional na proteína NifA que

impede a inibição por NifL em condições limitantes de nitrogênio (LITTLE & DIXON, 2003; MARTINEZ-ARGUDO et al. 2004a). O efeito do 2-oxoglutarato é suprimido por uma mutação no resíduo Arg 306 da proteína NifL. Este resíduo parece ser essencial para prevenir a inibição de NifA, e sua substituição por uma cisteína resulta na inibição constitutiva de NifA por NifL (MARTINEZ-ARGUDO et al. 2004b).

1.9.2. Controle da Atividade de NifA em organismos da Classe α -Proteobacteria

Nos diazotrofos da classe α das proteobactérias como *Azospirillum brasilense* e *Rhodospirillum rubrum*, um gene homólogo a NifL não foi detectado. Em *A. brasilense*, a expressão do gene *nifA* é reprimida parcialmente por amônio ou oxigênio (FADEL-PICHETH et al. 1999). No entanto, a expressão dos genes *nif* é regulada por oxigênio e amônio, sugerindo que a atividade de NifA é controlada por outros mecanismos (LIANG et al. 1991). A proteína GlnB é uma das responsáveis por este controle, já que no mutante *glnB* de *A. brasilense*, que é incapaz de fixar nitrogênio, a proteína NifA é expressa, mas o gene *nifH* não é transcrito (LIANG et al. 1992; de ZAMAROCZY et al. 1993). Além disso, ensaios *in vivo* com a proteína NifA de *A. brasilense* expressa em *E. coli*, mostraram que a proteína GlnB, mas não a proteína GlnZ, é essencial para a atividade de NifA (ARAÚJO et al. 2004).

O domínio N-terminal da NifA exerce um papel inibitório sobre a atividade desta proteína na presença de amônio. Em *A. brasilense*, proteínas NifA N-truncadas foram capazes de restaurar a expressão dos genes *nif* no mutante *glnB* em condições de nitrogênio limitante ou em excesso, sugerindo que a proteína GlnB é necessária para ativar NifA impedindo o efeito inibitório do domínio N-terminal (ARSENE et al. 1996). CHEN e colaboradores (2003) verificaram que a proteína GlnB interage com o domínio GAF N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*, mas não com os domínios central ou C-terminal. Neste estudo também foi observado que a proteína GlnZ não interage com NifA. Além disso, as proteínas mutantes NifA Y18F e NifA Y18/53F apresentaram atividade regulada por amônio mesmo na ausência da proteína GlnB (ARSENE et al. 1999, CHEN et al. 2005). Estes resíduos localizam-se no domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e não estão presentes nos organismos nos quais NifA é controlada por NifL, como *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*.

Em *R. rubrum*, a atividade da proteína NifA é regulada positivamente por GlnB-UMP (ZHANG et al. 2000). As proteínas GlnK e GlnJ não são capazes de substituir GlnB nesta interação. No entanto, a substituição de alguns aminoácidos em GlnJ foram suficientes para tornar esta proteína capaz de ativar NifA (ZHANG et al. 2001; ZHANG et al. 2004). ZHU et al. (2006) identificaram variantes da proteína GlnB capazes de interagir com a proteína NifA mesmo sem uridililação. Algumas destas variantes continuam a responder aos níveis de amônio, aparentemente por um mecanismo independente da uridililação por GlnD (ZHU et al. 2006).

Em *Rhodobacter capsulatus*, estudos utilizando a técnica de duplo-híbrido mostraram que as proteínas GlnB e GlnK são capazes de interagir com as proteínas NifA1 e NifA2 (PAWLOWSKI et al. 2003). Neste organismo, a atividade da proteína NifA é regulada por amônio nos mutantes *glnB*⁻ e *glnK*⁻, mas não no mutante duplo *glnB*⁻/*glnK*⁻, sugerindo que tanto GlnB como GlnK podem controlar a atividade de NifA (DREPPER et al. 2003).

1.9.3. Controle da Atividade de NifA em organismos da Classe β -Proteobacteria

O controle da atividade da proteína NifA na classe β das proteobactérias, difere entre seus membros *Azoarcus* sp. BH72 e *Herbaspirillum seropedicae*. *Azoarcus* sp. BH72 apresenta um operon homólogo ao operon *nifLA* encontrado em organismos da classe γ -Proteobacteria (EGENER et al. 2002). Neste organismo, a atividade da proteína NifA também é controlada via NifL em resposta aos níveis de amônio e oxigênio. No entanto, em contraste com o sistema regulatório de *K. pneumoniae*, a expressão do operon *nifLA* é detectada na presença de oxigênio e amônio, sendo maior na ausência de ambos (EGENER et al. 2002). As três proteínas do tipo PII encontradas neste organismo parecem estar envolvidas no controle da atividade da proteína NifA (MARTIN et al. 2000; MARTIN et al. 2002). A transcrição a partir do promotor do gene *nifH* de *Azoarcus* sp. BH72 sob condições limitantes de nitrogênio, não foi afetada pela deleção de *glnB*, *glnK* ou *glnB*/*glnK* sugerindo que a proteína GlnY, que é expressa neste mutante, é suficiente para o controle da atividade de NifA (MARTIN et al. 2002). No entanto, a presença das proteínas GlnB ou GlnK é necessária para reprimir a transcrição dos genes da nitrogenase em condições de excesso de nitrogênio (MARTIN et al. 2002).

Em *H. seropedicae*, vários genes relacionados com a fixação de nitrogênio foram identificados (SOUZA et al. 1991a; SOUZA et al. 1991b; MACHADO et al. 1996; BENELLI et al. 1997; PEDROSA et al. 1997; KLASSEN et al. 1999; PEDROSA et al. 2001; NOINDORF et al. 2006), no entanto, mesmo com o sequenciamento do seu genoma, o gene *nifL* não foi detectado. A expressão do gene *nifA* neste diazotrofo é insensível aos níveis de oxigênio, mas é reprimida por amônio e dependente de NtrC (SOUZA et al. 2000; WASSEM et al. 2000), enquanto a atividade da proteína NifA é controlada por amônio e oxigênio (SOUZA et al. 1999).

A proteína NifA inteira de *H. seropedicae* não apresenta atividade em *E. coli*, entretanto a forma N-truncada desta proteína é ativa e não responde aos níveis de nitrogênio (SOUZA et al. 1999; MONTEIRO et al. 1999a). Da mesma forma, a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* é capaz de complementar o mutante *nifA* de *A. brasilense*, porém não responde ao controle por amônio, sugerindo que o domínio N-terminal deve estar envolvido no monitoramento dos níveis de nitrogênio fixado (SOUZA et al. 1999). Este controle é restaurado quando o domínio N-terminal é co-expresso com a proteína NifA N-truncada em *E. coli* (MONTEIRO et al. 1999b).

Ensaio *in vitro* mostraram que ambas as proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* são capazes de interagir *in vitro* com o domínio N-terminal da proteína NifA (BENELLI et al. 2002a). Estirpes mutantes *glnK* de *H. seropedicae* são incapazes de fixar nitrogênio (NOINDORF, 2006). A atividade de fixação destas estirpes foi restaurada pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do seu próprio promotor, sugerindo que a proteína GlnK de *H. seropedicae* controla a atividade da proteína NifA interagindo com seu domínio N-terminal. A expressão da proteína GlnB a partir de um plasmídeo foi capaz de restaurar parcialmente a fixação de nitrogênio nestas estirpes, indicando que a proteína GlnB possa substituir GlnK quando expressa em maiores quantidades (NOINDORF, 2006).

A proteína GlnB de *H. seropedicae* foi capaz de ativar a proteína NifA de *K. pneumoniae* em diferentes estirpes de *E. coli* (*glnB*⁻/*glnK*⁻, *glnD*⁻ e selvagem) (BONATTO et al. 2005). Além da proteína GlnB nativa também foram avaliadas quatro formas mutantes desta proteína: GlnB Q3R/T5A (substituição de dois resíduos localizados na região N-terminal), GlnB Y51F (substituição do sítio de uridililação localizado na volta T), GlnB G108A/P109A e GlnB G108W (substituição de resíduos da região C-terminal) (Figura 5).

FIGURA 5 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS GlnB DE *H. seropedicae* E SUAS FORMAS MUTANTES

```

          1          10          20          30          40          50          60
GlnB      MKQVTAI IKPFKLDEVRESLAEVGVTGLTVTEVKGFGRQKGHTELYRGAEYVVDLFPKVK
GlnB Y51F  MKQVTAI IKPFKLDEVRESLAEVGVTGLTVTEVKGFGRQKGHTELYRGAEYVVDLFPKVK
GlnB G108A/P109A MKQVTAI IKPFKLDEVRESLAEVGVTGLTVTEVKGFGRQKGHTELYRGAEYVVDLFPKVK
GlnB Q3R/T5A  MKRVA AI IKPFKLDEVRESLAEVGVTGLTVTEVKGFGRQKGHTELYRGAEYVVDLFPKVK
GlnB G108W    MKQVTAI IKPFKLDEVRESLAEVGVTGLTVTEVKGFGRQKGHTELYRGAEYVVDLFPKVK
          ** * *****

          70          80          90          100          112
GlnB      IEVVDDKVVVEQAVDAI IKAARTGKIGDGKIFVQEVEQVIRIRTGETGPD AV
GlnB Y51F  IEVVDDKVVVEQAVDAI IKAARTGKIGDGKIFVQEVEQVIRIRTGETGPD AV
GlnB G108A/P109A IEVVDDKVVVEQAVDAI IKAARTGKIGDGKIFVQEVEQVIRIRTGETAAD AV
GlnB Q3R/T5A  IEVVDDKVVVEQAVDAI IKAARTGKIGDGKIFVQEVEQVIRIRTGETGPD AV
GlnB G108W    IEVVDDKVVVEQAVDAI IKAARTGKIGDGKIFVQEVEQVIRIRTGETWPD AV
          *****

```

O alinhamento das sequências de aminoácidos foi realizado no programa ClustalW (THOMPSON et al. 1994).

Todas as proteínas avaliadas foram capazes de ativar a proteína NifA de *K. pneumoniae*. No entanto, a resposta da proteína NifA ao controle por amônio foi diferente na presença das formas mutantes de GlnB. Na presença da proteína GlnB Y51F, a proteína NifA de *K. pneumoniae* apresentou menor regulação por amônio do que quando em presença das outras proteínas GlnB testadas. Por outro lado, na estirpe *glnD*⁻, na presença da proteína GlnB G108W, a proteína NifA apresentou atividade altamente regulada por amônio, sugerindo que a região C-terminal e a volta T da proteína GlnB de *H. seropedicae* estão envolvidos na sinalização dos níveis de nitrogênio (BONATTO et al. 2005). Além disso, na presença da proteína GlnB G108A/P109A, a atividade da proteína NifA foi menor do que a observada na presença da proteína GlnB nativa em todas as estirpes avaliadas. Por outro lado, a atividade da proteína NifA de *K. pneumoniae* em presença da proteína GlnB Q3R/T5A foi similar à observada com a proteína GlnB nativa (BONATTO et al. 2005).

Em *H. seropedicae*, a atividade da proteína NifA é controlada tanto pelos níveis de amônio como de oxigênio (SOUZA et al. 1999). Enquanto a proteína GlnK está envolvida na sinalização dos níveis de nitrogênio para NifA, a proteína Fnr parece estar envolvida na sinalização dos níveis de oxigênio. A proteína Fnr, sensora de oxigênio, é necessária para a atividade da proteína NifA de *H. seropedicae*, já que a proteína NifA N-truncada é inativa e mais suscetível à degradação em um mutante *fnr* de *E. coli* (MONTEIRO et al. 2003). Três genes semelhantes a *fnr* foram encontrados no genoma de *H. seropedicae* (Projeto Genopar), portanto é possível que a proteína Fnr esteja envolvida com o controle da atividade de NifA em *H. seropedicae*.

1.10. OUTRAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS PII

O controle do metabolismo de nitrogênio varia nos diferentes grupos de bactérias, bem como os papéis desempenhados pelas proteínas PII nestes sistemas. As funções das proteínas PII foram melhor estudadas nas proteobactérias, mas algumas funções de PII já foram caracterizadas em outros grupos.

Na bactéria Gram-positiva *Corynebacterium glutamicum* (Filo Actinobacteria), a proteína GlnK, única proteína do tipo PII presente neste organismo, controla a

atividade da proteína AmtR, um regulador transcricional que reprime a transcrição de uma série de genes em condições de excesso de nitrogênio (STRÖSSER et al. 2004; BECKERS et al, 2005). Em baixas condições de amônio, a proteína GlnK é adenililada pela proteína GlnD. GlnK-AMP parece interagir com a proteína AmtR permitindo a expressão dos genes controlados por este regulador. Quando os níveis de amônio aumentam, a proteína GlnK é desadenililada. Nesta forma, GlnK é incapaz de interagir com AmtR, que bloqueia a transcrição dos genes que fazem parte do seu regulon (STRÖSSER et al. 2004). Em *Bacillus subtilis*, outra bactéria Gram-positiva (Filo Firmicutes), estudos *in vitro* mostraram que a proteína TnrA, um regulador da expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio, é sequestrado para a membrana citoplasmática através da formação de um complexo entre TnrA, GlnK e AmtB (HEINRICH et al. 2006).

Em *Synechococcus* estirpe PCC7942 (Filo Cyanobacteria), a proteína GlnK, única proteína do tipo PII presente neste organismo, está envolvida na captação de nitrato e nitrito, no controle da expressão de genes regulados por amônio e na síntese de arginina. Neste organismo, a captação de nitrato e nitrito é inibida na presença de amônio, mas no mutante *glnK* a captação ocorre mesmo na presença de amônio (LEE et al. 1998). Quando uma proteína GlnK que não pode ser fosforilada foi expressa nesta estirpe, a capacidade de captar nitrato foi perdida, sugerindo que a forma fosforilada da proteína GlnK está envolvida na regulação da captação de nitrato e nitrito (LEE et al. 2000).

A proteína GlnK também está envolvida no controle da atividade da proteína NtcA, um ativador transcricional de genes sujeitos a repressão por amônio em *Synechococcus* estirpe PCC7942 (ALDEHNI et al. 2003). A comunicação entre as proteínas GlnK e NtcA é mediada pela proteína PipX, que interage com ambas as proteínas (ESPINOSA et al. 2006). Na presença de altos níveis de amônia (baixos níveis de 2-oxoglutarato), a proteína PipX liga-se à proteína GlnK que está desfosforilada e a proteína NtcA encontra-se inativa. Na presença de nitrato, parte da proteína GlnK encontra-se na forma fosforilada e os níveis moderados de 2-oxoglutarato fazem com que a proteína PipX ligue-se alternadamente com as proteínas GlnK e NtcA. Nestas condições, a proteína NtcA é encontrada nas formas ativa e inativa e a proteína GlnK nas formas fosforilada e desfosforilada. Em condições limitantes de nitrogênio (altos níveis de 2-oxoglutarato), a proteína GlnK é

totalmente fosforilada e a proteína PipX interage com a proteína NtcA, a qual é completamente ativada (ESPINOSA et al. 2006).

Em muitas cianobactérias, a arginina é utilizada na formação do copolímero de reserva de nitrogênio denominado de cianoficina (ALLEN, 1988). A proteína NAGK (N-acetilglutamato quinase) é a enzima que catalisa a etapa chave na síntese de arginina, e sua atividade é controlada pela proteína GlnK através da formação de um complexo entre estas proteínas (HEINRICH et al. 2004). Em altas concentrações de nitrogênio, a proteína GlnK desfosforilada interage com a proteína NAGK estimulando sua atividade catalítica. A formação deste complexo não requer efetores, mas é inibida por ATP na presença de 2-oxoglutarato e por ADP (MAHESWARAN et al. 2004). Em baixas concentrações de nitrogênio, a proteína GlnK está fosforilada e não interage com a enzima NAGK, que na forma livre é fortemente inibida por arginina (MAHESWARAN et al. 2004).

Algumas funções das proteínas PII também foram estudadas em organismos do Domínio Archaea. No metanógeno diazotrófico *Methanococcus maripaludis*, as proteínas do tipo PII denominadas de Nifl₁ e Nifl₂, são necessárias para o desligamento da nitrogenase em resposta ao aumento dos níveis de amônio (KESSLER et al. 2001). Em *Methanosarcina mazei* estirpe Gö1, outro metanógeno diazotrófico, a atividade da enzima glutamina sintetase (GlnA₁) não é controlada por adenililação como nas proteobactérias, mas pela proteína GlnK₁ (homóloga à GlnK de *E. coli*) (EHLERS et al. 2005). Em resposta a um aumento nos níveis de amônio, a proteína GlnK₁ interage diretamente com a proteína GlnA₁ inibindo sua atividade. Em baixos níveis de nitrogênio, a atividade de GlnA₁ é estimulada por 2-oxoglutarato (EHLERS et al. 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica que foi isolada inicialmente da rizosfera de gramíneas e posteriormente de raízes de milho, sorgo e arroz e de caules e folhas de diferentes culturas de cana-de-açúcar, bananeira e abacaxizeiro e em algumas espécies de gramíneas forrageiras (PIMENTEL et al. 1991; BALDANI et al. 1986; BALDANI et al. 1992; OLIVARES et al. 1996; JAMES & OLIVARES, 1998; WEBER et al. 1999). A baixa taxa de sobrevivência deste organismo nos solos sugere tratar-se de um microrganismo endofítico (DÖBEREINER, 1992). A inoculação de *H. seropedicae* em arroz leva a um aumento do peso úmido e seco das plantas (BALDANI et al. 1996). A estirpe de *H. seropedicae* LR15, quando inoculada em arroz, foi capaz de colonizar a superfície das raízes e os tecidos internos, e resultou em aumento da biomassa radicular (RONCATO-MACCARI et al. 2003a, RONCATO-MACCARI et al. 2003b).

O estudo dos mecanismos de regulação e controle do metabolismo da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* e em outros diazotrofos pode contribuir para a engenharia de novas estirpes que fixem mais nitrogênio para as plantas, aumentando a eficiência do processo. Os estudos realizados até aqui com *H. seropedicae* e outros organismos evidenciam a importância das proteínas da família PII não só na regulação da fixação de nitrogênio, mas no controle do metabolismo de nitrogênio em geral, principalmente pela sua capacidade de interação simultânea com outras proteínas e com moléculas efetoras. Assim, a caracterização funcional das proteínas PII de *H. seropedicae* pode revelar pontos importantes no controle do metabolismo de nitrogênio deste organismo.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar as proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* e as proteínas GlnB mutantes GlnB G108A/P109A, GlnB G108W e GlnB Q3R/T5A através do estudo da modificação destas proteínas pela proteína GlnD de *H. seropedicae* e da participação das moléculas efetoras neste processo.

Objetivos Específicos

- Clonar os genes *glnB* mutantes em vetor de expressão;
- Expressar e purificar as proteínas GlnB, GlnK e GlnD de *H. seropedicae* e GlnB mutantes GlnB G108A/P109A, GlnB G108W e GlnB Q3R/T5A;
- Avaliar o perfil de uridililação das proteínas GlnB, GlnK e GlnB mutantes GlnB G108A/P109A, GlnB G108W e GlnB Q3R/T5A;
- Avaliar o efeito das moléculas 2-oxoglutarato, ATP, ADP e AMP sobre a uridililação das proteínas PII;
- Avaliar o efeito inibitório da glutamina sobre a uridililação das proteínas PII;
- Avaliar o perfil de desuridililação das proteínas GlnB e GlnK na presença das moléculas efetoras ATP e ADP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ESTIRPES E PLASMÍDEOS

As estirpes bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1.

TABELA 1- Estirpes e plasmídeos

ESTIRPES / PLASMÍDEOS	GENÓTIPO / FENÓTIPO	REFERÊNCIA / FONTE
<i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>mrcA</i> $\Delta\phi$ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>araD139</i> <i>galU</i> <i>galK</i> <i>nupG</i> <i>rpsL</i> λ ⁻	SAMBROOK et al. 1989
RB9065 λ DE3	<i>glnB2306</i> <i>glnD99::Tn10</i> , Tc ^R (promotor T7 polimerase)	BENELLI et al. 2001
Plasmídeos		
pACB3	Km ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação na sequência que codifica para os resíduos 108 e 109 (G108A/P109A) em pET29a+, pT7	BONATTO, 2000
pACB60	Amp ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação na sequência que codifica para os resíduos 3 e 5 (Q3R/T5A) em pTZ18R, <i>plac</i>	BONATTO et al. 2005
pACB70	Amp ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação na sequência que codifica para o resíduo 108 (G108W) em pTZ18R, <i>plac</i>	BONATTO et al. 2005
pACB61	Km ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação na sequência que codifica para os resíduos 3 e 5 (Q3R/T5A) em pET29a+, pT7	Este trabalho
pACB71	Km ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> com mutação na sequência que codifica para o resíduo 108 (G108W) em pET29a+, pT7	Este trabalho
pEMB101.8	Km ^R , <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET28b+ (com deleção da cauda His), pT7	BENELLI et al. 2001
pEMB200	Km ^R , <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET29a+, pT7	BONATTO et al. 2007
pET29a+	Km ^R , vetor de expressão (sem cauda His), pT7	Novagen
pGH2	Km ^R , <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> em pET29a+, pT7	BONATTO et al. 2007
pTZ18R	Amp ^R , vetor multifuncional de clonagem e sequenciamento, <i>plac</i>	MEAD et al. 1986

4.2. MEIOS DE CULTURA

4.2.1. Meios Utilizados para o Cultivo de *E. coli*

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Broth (LB), SOB e SOC. O meio LB (SAMBROOK et al. 1989) apresenta a seguinte composição:

Componentes	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Triptona	10,0
NaCl	10,0

O meio sólido (LA) foi obtido pela adição de 15 g/L de ágar ao meio líquido.

O meio SOB (SAMBROOK et al. 1989) apresenta a seguinte composição:

Componentes	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Triptona	20,0
NaCl	0,6
KCl	0,186

O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH.

O meio SOC foi obtido pela adição de glucose (3,6 g/L), MgCl₂ (0,94 g/L) e MgSO₄ (1,2 g/L) ao meio SOB.

4.2.2. Antibióticos

Os antibióticos foram usados nas seguintes concentrações: ampicilina 250 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml e canamicina 50 µg/ml. As soluções estoque foram preparadas como descrito por SAMBROOK et al. (1989) e mantidas sob refrigeração a 4°C.

4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C. As culturas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120 rpm. Os estoques de *E. coli* foram mantidos em glicerol 50% e armazenados a -20°C ou -70°C.

4.4. MANIPULAÇÃO GÊNICA

As reações de restrição e ligação, e as técnicas de purificação de DNA e eletroporação foram realizadas conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989).

4.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína dos extratos de célula e das proteínas purificadas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). O padrão de proteína utilizado foi soro albumina bovina.

4.6. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS – PAGE) (LAEMMLI, 1970)

As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por LAEMMLI (1970). O gel separador continha acrilamida 10% ou 15% (solução estoque 29% de acrilamida e 1% de bis-acrilamida), Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,3%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED (N, N, N', N' - tetrametiletenodiamina) 0,1%. O gel empilhador continha acrilamida 6%, Tris-HCl 167 mM pH 6,8, SDS 0,24%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%.

O tampão de amostra (Tris-HCl 12 mM pH 6,8, glicerol 5%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mM e azul de bromofenol 0,02%) foi preparado 5 vezes concentrado. As amostras misturadas a este tampão foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e centrifugadas por 2 minutos. As corridas foram feitas a 180 V por 1 hora em tampão Laemmli (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH 8,3). Este tampão foi preparado 10 vezes concentrado, mantido à temperatura ambiente e diluído no

momento do uso. Os géis foram corados com *coomassie blue* R250 0,1% (10% de ácido acético e 40% de metanol) ou nitrato de prata (BLUM et al. 1987).

4.7. ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES PARA PROTEÍNAS DE BAIXA MASSA MOLECULAR (SCHAGGER & von JAGOW, 1987)

As condições descritas por SCHAGGER & von JAGOW (1987) são indicadas para proteínas de 1 a 100 kDa porque permitem uma melhor separação entre as bandas de baixa massa molecular. O gel separador continha acrilamida 15% (solução estoque 29% de acrilamida e 1% de bis-acrilamida), Tris-HCl 1 M pH 8,45, SDS 0,1%, glicerol 15%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. O gel empilhador continha acrilamida 4%, Tris-HCl 750 mM pH 8,45, SDS 0,075%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. As amostras foram preparadas como descrito no item anterior. Os géis foram submetidos a corridas de 2 horas a 160 V nos tampões cátodo (Tris 100 mM, tricina 100 mM, SDS 0,1%, pH 8,25) e ânodo (Tris 200 mM pH 8,9). Os géis foram corados com *coomassie blue* R250 0,1% (10% de ácido acético e 40% de metanol).

4.8. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES NÃO DESNATURANTES

As condições de eletroforese não desnaturante em gel descontínuo foram aquelas descritas por FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC (1994). O gel separador continha acrilamida 9% (solução estoque 29% de acrilamida e 1% de bis-acrilamida), Tris-HCl 450 mM pH 8,9, Nonidet P-40 0,025%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. O gel empilhador continha acrilamida 2,5% (solução estoque 10% de acrilamida e 2,5% de bis-acrilamida), Tris-H₃PO₄ 62,5 mM pH 6,9, Nonidet P-40 0,031%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%.

O tampão de amostra não desnaturante foi preparado 5 vezes concentrado (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, EDTA 20 mM, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,02%). As corridas foram realizadas a 100 V por 3 a 4 horas em tampão de corrida para proteína nativa (Tris 5 mM e glicina 38,4 mM). Este tampão foi preparado 50 vezes

concentrado, mantido à temperatura ambiente e diluído no momento do uso. Os géis foram corados com SyPro Ruby (Invitrogen).

4.9. CLONAGEM DOS GENES *glnB* DE *H. seropedicae* COM MUTAÇÕES NAS SEQUÊNCIAS QUE CODIFICAM PARA OS RESÍDUOS G108W E Q3R/T5A NO VETOR DE EXPRESSÃO pET29a+

O plasmídeo pACB70, que contém o gene *glnB* mutagenizado na sequência que codifica para o resíduo 108 (G108W) inserido no vetor pTZ18R foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Hind*III liberando um fragmento contendo o gene *glnB* mutante. Este fragmento foi ligado ao vetor pET29a+ tratado com as mesmas enzimas. O sistema de ligação foi eletroporado na estirpe de *E. coli* DH10B e os plasmídeos isolados das colônias transformantes foram tratados com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III. O produto da restrição foi analisado por eletroforese em gel de ágar 1,5% e o plasmídeo construído foi denominado pACB71.

A partir do plasmídeo pACB60, o gene *glnB* mutagenizado na sequência que codifica para os resíduos 3 e 5 (Q3R/T5A) foi clonado no vetor de expressão pET29a+. O plasmídeo pACB60 foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Hind*III liberando o gene *glnB* que foi ligado ao vetor pET29a+ tratado com as mesmas enzimas. O sistema de ligação foi eletroporado na estirpe DH10B de *E. coli*. Os plasmídeos isolados das colônias transformantes foram digeridos com as enzimas *Xba*I e *Hind*III e o produto da restrição foi analisado por eletroforese em gel de ágar 1,5% para confirmar a inserção do gene *glnB* mutante no vetor pET29a+. Este plasmídeo foi denominado pACB61.

4.10. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae*

As proteínas GlnB e GlnK nativas e GlnB mutantes foram expressas a partir de vetores pET em células de *E. coli* estirpe RB9065λDE3 (*glnB*⁻/*glnD*⁻). As proteínas nativas foram expressas a partir dos plasmídeos pEMB101.8, que contém o gene *glnB* em pET28b+ (com deleção da cauda de histidinas) e pEMB200, que contém o gene *glnK* em pET29a+. As proteínas GlnB mutantes foram expressas a partir dos

plasmídeos pACB3 (*glnB* G108A/P109A), pACB71 (*glnB* G108W) e pACB61 (*glnB* Q3R/T5A), todos em vetor pET29a+.

Os plasmídeos foram introduzidos por eletroporação na estirpe RB9065λDE3 e três colônias de cada transformante foram inoculadas em 50 mL de meio LB contendo glutamina 0,2%, tetraciclina 10 µg/mL e canamicina 50 µg/mL e incubadas por 16 horas em agitador rotatório a 37° C. As culturas foram re-inoculadas (2 mL) em 5 L de meio LB, contendo glutamina e os antibióticos nas concentrações citadas e incubadas a 37° C. Após a cultura atingir uma D.O. (600 nm) entre 0,05 e 0,1, foi adicionado 0,5 mM de IPTG (isopropil-tio-galactosídeo) e a cultura foi incubada por mais 3 horas a 37° C. As culturas foram centrifugadas a 18.800g por 10 minutos e as células coletadas foram dissolvidas em aproximadamente 6 mL de tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, glicerol 50%). Em seguida foi adicionado PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) (1 mM) e a mistura foi congelada a -70° C.

4.11. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB, GlnK E GlnB MUTANTES DE *H. seropedicae*

As células coletadas após cada indução (item 4.10) foram incubadas com lisozima (50 µg/mL) em gelo por 30 minutos e sonicadas por 30 segundos 7 vezes com intervalos de 1 minuto (Ultrasonic Processor XL, Heat Systems). O lisado foi diluído 5 vezes em tampão de sonicação sem glicerol resultando em um volume aproximado de 30 mL e em seguida centrifugado a 26.900g por 10 minutos. O sobrenadante foi tratado com sulfato de estreptomicina 2% sob agitação por 30 minutos a 0° C. O lisado tratado foi centrifugado a 26.900g por 30 minutos e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca iônica Q-Sepharose (GE Healthcare: 20 cm de altura, 1,6 cm de diâmetro, aproximadamente 40 mL) pré-equilibrada com tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM e glicerol 10%) e conectada a um sistema ÄKTA (GE Healthcare). A amostra foi injetada na coluna com um fluxo de 1 mL/minuto. A coluna foi lavada com tampão A (2 mL/minuto) até a estabilização da linha de base e a proteína foi eluída com um gradiente de concentração de NaCl que variou de 0,05 M (tampão A) a 1 M (tampão B: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 1 M, EDTA 1 mM e glicerol 10%). Durante a eluição

foram coletadas 20 alíquotas de 5 mL a um fluxo de 2 mL/minuto. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante 15% e agrupadas em diferentes frações de acordo com o grau de pureza da proteína.

As frações foram tratadas com sulfato de amônio 75% (30 minutos sob leve agitação) e centrifugadas a 26.900g por 30 minutos. O precipitado de cada fração foi dissolvido em 200 μ L de tampão A 5% (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM e glicerol 5%) e aplicado em uma coluna de gel filtração Superdex 75 (GE Healthcare: 30 cm de altura, 1 cm de diâmetro, aproximadamente 24 mL). A coluna foi pré-equilibrada com tampão A 5% e conectada a um sistema ÄKTA. O sistema foi operado a um fluxo de 0,3 mL por minuto. Após a injeção da amostra, alíquotas de 0,6 mL foram coletadas. A presença de proteína nas amostras foi verificada por eletroforese em gel desnaturante 15% e as alíquotas foram agrupadas em frações de acordo com a quantidade e pureza da proteína. As frações foram dialisadas em tampão A contendo glicerol 50%.

Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4° C e a proteína foi estocada a -20° C.

4.12. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *GlnD* DE *H. seropedicae*

O plasmídeo pGH2, que contém o gene *glnD* inserido no vetor pET29a+, foi introduzido por eletroporação na estirpe RB9065 λ DE3. As colônias transformantes foram inoculadas em 50 mL de meio LB contendo glutamina 0,2%, tetraciclina 10 μ g/mL e canamicina 50 μ g/mL e incubadas por 16 horas em agitador rotatório a 30° C. As culturas foram re-inoculadas (5 mL) em 1 L de meio LB, contendo glutamina e os antibióticos nas concentrações citadas e incubadas a 30° C. Após a cultura atingir uma D.O. (600 nm) entre 0,2 e 0,3, foi adicionado 0,5 mM de IPTG e a cultura foi incubada por mais 4 horas a 30° C. As culturas foram centrifugadas a 18.800g por 10 minutos e as células dissolvidas em aproximadamente 10 mL de tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mM pH 7,0, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, glicerol 50%). Em seguida, 1 mM de PMSF foi adicionado e a mistura foi congelada a -70° C.

4.13. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae*

As células dissolvidas em tampão de sonicação (item 4.12) foram incubadas com 50 µg/mL de lisozima em gelo por 30 minutos e sonicadas por 30 segundos 9 vezes com intervalos de 1 minuto. O lisado foi diluído em tampão de sonicação sem glicerol e sem NaCl resultando em um volume aproximado de 20 mL. Após centrifugação a 26.900g por 10 minutos, o sobrenadante foi tratado com sulfato de estreptomicina 2% por 30 minutos a 0° C. O lisado tratado foi centrifugado a 26.900g por 30 minutos e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose (GE Healthcare: 20 cm de altura, 1,6 cm de diâmetro, aproximadamente 40 mL) pré-equilibrada com tampão C (Tris-HCl 50 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, DTT 1 mM e glicerol 10%) e conectada a um sistema ÄKTA. Após a injeção da amostra (1 mL/minuto) a coluna foi lavada com tampão C (2 mL/minuto) e a proteína foi eluída com um gradiente de concentração de NaCl que variou de 0,1 M (tampão C) a 1 M (tampão D: Tris-HCl 50 mM pH 7,0, NaCl 1 M, DTT 1 mM e glicerol 10%). Durante a eluição foram coletadas 40 alíquotas de 5 mL a um fluxo de 2 mL/minuto. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante 10% e agrupadas em diferentes frações de acordo com a quantidade e o grau de pureza da proteína.

A fração com maior quantidade da proteína GlnD foi diluída em tampão C sem glicerol e aplicada manualmente em uma coluna Agarose-Heparina (GE Healthcare: 2,5 cm de altura, 0,7 cm de diâmetro, 1 mL) previamente equilibrada com tampão C. Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão C e a proteína foi eluída com um gradiente descontínuo de concentração de NaCl de 0,1 M (tampão C) a 1 M (tampão D) variando 0,1 M por etapa. Dez alíquotas de 1 mL foram coletadas e analisadas por eletroforese em gel desnaturante 10%. As frações que continham a proteína GlnD foram dialisadas em tampão C contendo glicerol 50% e estocadas a -70° C.

4.14. ENSAIOS DE URIDILILAÇÃO

A atividade de uridililtransferase da proteína GlnD de *H. seropedicae* foi verificada através de ensaios de uridililação *in vitro* das proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae*. O sistema geral de reação continha 2 µM das proteínas GlnB ou GlnK

de *H. seropedicae* purificadas (item 4.11), 0,1 μM da proteína GlnD purificada (item 4.13) ou a quantidade indicada no ensaio, UTP 1 mM, ATP 0,2 mM e 2-oxoglutarato 5 mM em tampão de uridililação (Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), KCl 100 mM e MgCl_2 25 mM) em um volume final de 15 μL . As reações foram iniciadas pela adição de 1 mM de UTP e incubadas a 30°C. Após o tempo indicado em cada experimento, as reações foram interrompidas pela adição de 5 μL de tampão de amostra não desnaturante (item 4.8) e mantidas no gelo. O volume total de cada reação foi aplicado em gel de acrilamida não desnaturante 9% (item 3.4). Os géis foram submetidos a uma corrida de 100 V por 4 horas e em seguida corados com SyPro Ruby (Invitrogen). A análise densitométrica foi realizada através do programa LabWorks Image Acquisition and Analysis, versão 4.0.0.8 (UVP).

4.14.1. Efeito da Concentração da Enzima GlnD

O efeito da concentração da proteína GlnD foi avaliado em reações contendo 2 μM das proteínas GlnB ou GlnK, UTP 1 mM, ATP 0,2 mM, 2-oxoglutarato 5 mM e diferentes quantidades da enzima (0 a 100 nM) em tampão de uridililação. As reações foram iniciadas pela adição de UTP e interrompidas após 10 minutos pela adição de tampão de amostra. O volume total de cada reação foi aplicado em gel não desnaturante 9%. Após a corrida eletroforética, as amostras foram coradas e as bandas correspondentes aos diferentes estados de uridililação das proteínas PII foram quantificadas por densitometria. As quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a porcentagem de monômeros uridililados em cada ensaio utilizando a seguinte fórmula:

$$[\text{GlnB(UMP)}_1 \times 1/3] + [\text{GlnB(UMP)}_2 \times 2/3] + [\text{GlnB(UMP)}_3 \times 1]$$

A porcentagem de uridililação obtida para cada ensaio foi utilizada para calcular o número de monômeros uridililados, considerando que 100% de uridililação corresponde a 3 monômeros uridililados.

4.14.2. Efeito do Tempo

Para avaliar a linearidade da reação de uridililação ao longo do tempo as proteínas GlnB, GlnK, GlnB G108A/P109A e GlnB G108W foram incubadas com a enzima GlnD por diferentes períodos de tempo (0 a 20 minutos). A reação completa continha 2 μ M das proteínas PII, GlnD 10 nM, UTP 1 mM, ATP 0,2 mM e 2-oxoglutarato 5 mM. O resultado dos ensaios foi verificado por eletroforese em condições não desnaturantes. As bandas foram quantificadas por análise densitométrica.

4.14.3. Efeito da Concentração de 2-oxoglutarato

O efeito da concentração de 2-oxoglutarato na uridililação das proteínas PII foi avaliado em reações contendo 2 μ M das proteínas GlnB, GlnK, GlnB G108A/P109A ou GlnB G108W, GlnD 50 nM, UTP 1 mM, ATP 1 mM e diferentes quantidades da molécula efetora (0 a 5 mM). As reações foram iniciadas pela adição de UTP, incubadas por 5 minutos e interrompidas pela adição de tampão de amostra não desnaturante.

4.14.4. Efeito da Concentração de ATP

O efeito da concentração de ATP na uridililação das proteínas PII foi avaliado em reações contendo 2 μ M das proteínas GlnB, GlnK, GlnB G108A/P109A ou GlnB G108W, GlnD 50 nM, UTP 1 mM, 2-oxoglutarato 5 mM e diferentes quantidades da molécula efetora (0 a 500 μ M). As reações foram iniciadas pela adição de UTP, incubadas por 5 minutos e interrompidas pela adição de tampão de amostra não desnaturante.

4.14.5. Efeito da Concentração de ADP e AMP

O efeito da presença dos nucleotídeos ADP e AMP na uridililação das proteínas PII foi avaliado em reações contendo 2 μ M das proteínas GlnB e GlnK,

GlnD 100 nM, UTP 1 mM, 2-oxoglutarato 5 mM e diferentes quantidades de ATP, ADP ou AMP (0 a 500 μ M). As reações foram iniciadas pela adição de UTP, incubadas por 10 minutos e interrompidas pela adição de tampão de amostra não desnaturante.

4.14.6. Efeito da Concentração de Glutamina

O efeito da glutamina sobre a uridililação das proteínas PII de *H. seropedicae* foi avaliado em sistemas de reação contendo GlnB, GlnK ou GlnB mutantes (2 μ M), GlnD 100 nM, UTP 1 mM, ATP 0,2 mM e 2-oxoglutarato 5 mM, incubados na presença de diferentes concentrações de glutamina (0 a 5 mM). Para cada uma das concentrações testadas, a uridililação das PII foi acompanhada em diferentes tempos de incubação (0 a 40 minutos). Cada um dos ensaios foi avaliado em gel desnaturante e as bandas foram quantificadas por densitometria.

4.14.7. Uridililação da Proteína Mutante GlnB Q3R/T5A

A uridililação da proteína GlnB Q3R/T5A não pode ser avaliada em gel nativo pois esta proteína apresenta migração distorcida quando aplicada neste sistema. O perfil de uridililação desta proteína foi avaliado em eletroforese sob condições desnaturantes para proteínas de baixa massa molecular (SCHAGGER & von JAGOW, 1987). A reação continha 2 μ M das proteínas GlnB nativa ou GlnB Q3R/T5A, GlnD 100 nM, UTP 1 mM, ATP 0,2 mM e 2-oxoglutarato 5 mM em tampão de uridililação em um volume final de 15 μ L. A reação foi iniciada pela adição de UTP e incubada por diferentes períodos de tempo (0 a 30 minutos). A reação foi interrompida pela adição de tampão de amostra desnaturante (item 4.6) e mantida em gelo. O volume total da reação foi aplicado em gel desnaturante nas condições descritas no item 4.7. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen) e quantificadas por análise densitométrica. Este gel permite a visualização de apenas duas bandas correspondentes às formas monoméricas das proteínas PII, com ou sem a adição de um UMP. Desta forma a quantificação das bandas fornece diretamente a porcentagem de monômeros uridililados.

4.15. ENSAIOS DE DESURIDILILAÇÃO

A atividade da proteína GlnD de *H. seropedicae* como removedora de uridilil foi avaliada através de ensaios de desuridililação *in vitro*. Inicialmente, as proteínas PII foram uridililadas em um sistema que continha 2 μM das proteínas GlnB ou GlnK, 100 nM da proteína GlnD, UTP 1 mM, ATP 0,2 mM e 2-oxoglutarato 0,5 mM em tampão de uridililação em um volume final de 450 μL . A reação foi iniciada com UTP e incubada durante 60 minutos a 30°C. Duas alíquotas de 30 μL foram retiradas (uma no início e outra no final reação) e misturadas com 10 μL de tampão de amostra. O sistema de uridililação foi incubado a 60°C por 15 minutos para inativar a enzima GlnD. As proteínas PII uridililadas (GlnB-UMP ou GlnK-UMP) foram purificadas com uma coluna de gel filtração de 1 mL de resina Sephadex G-25 (SIGMA). As proteínas foram diluídas 10x em tampão contendo Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), KCl 100 mM e glicerol 10%. Em seguida, as proteínas foram concentradas utilizando uma coluna de ultrafiltração Vivaspin 6 (Vivascience) e a concentração das proteínas foi determinada utilizando o kit Quant-iT Protein e o fluorômetro Qubit (Invitrogen).

O sistema de desuridililação continha ATP 0,2 mM, 2-oxoglutarato 0,3 mM, glutamina 5 mM e diferentes quantidades de GlnD (0 a 2 μM) no mesmo tampão utilizado para a reação de uridililação em um volume final de 15 μL . As reações foram iniciadas pela adição de 2 μM das proteínas GlnB-UMP ou GlnK-UMP e incubadas a 30°C. Após 40 minutos as reações foram interrompidas pela adição de 5 μL de tampão de amostra não desnaturante e mantidas em gelo. O volume total de cada reação foi aplicado em gel de acrilamida não desnaturante 9% e submetido a uma corrida eletroforética de 100 V por 4 horas. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen) e as bandas quantificadas por análise densitométrica.

5. RESULTADOS

5.1. CLONAGEM DOS GENES *glnB* DE *H. seropedicae* MUTANTES (G108W E Q3R/T5A) NO VETOR DE EXPRESSÃO pET29a+

As formas mutantes da proteína GlnB de *H. seropedicae* GlnB G108W E GlnB Q3R/T5A foram obtidas anteriormente através de mutagênese aleatória do gene *glnB* (BONATTO et al. 2005). O plasmídeo pACB60 contém o gene *glnB* mutagenizado na sequência que codifica para os resíduos 3 e 5 (Q3R/T5A) e o plasmídeo pACB70 contém o gene *glnB* com mutação na sequência do resíduo 108 (G108W), ambos no vetor pTZ18R. A partir destes plasmídeos os genes mutantes foram clivados e inseridos no vetor de expressão pET29a+, originando os plasmídeos pACB61 (*glnB* Q3R/T5A) e pACB71 (*glnB* G108W). A clonagem no vetor pET permite a superexpressão das proteínas a partir do promotor *pT7*.

5.2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae* E GlnB MUTANTES

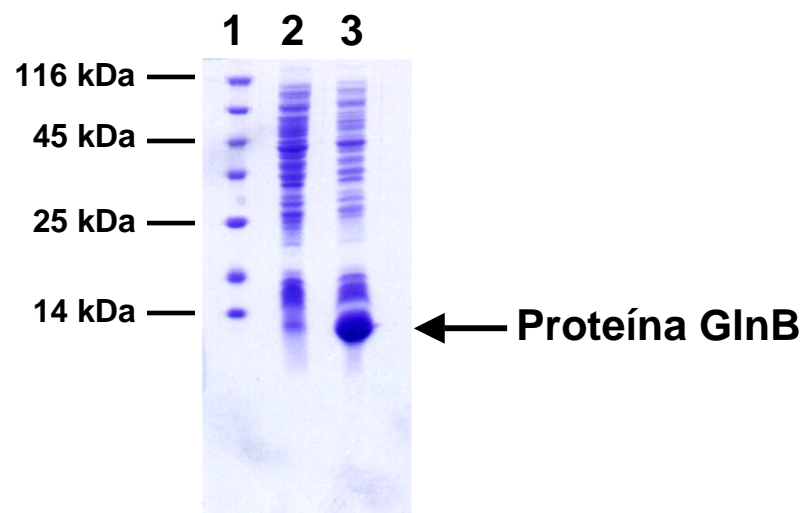
As proteínas de *H. seropedicae* foram superexpressas em células de *E. coli* estirpe RB9065λDE3, um mutante duplo *glnB*⁻/*glnD*⁻ que expressa a RNA polimerase do fago T7 (BENELLI et al. 2001). A mutação do gene *glnD* nesta estirpe permite que as proteínas PII sejam purificadas na sua forma não-uridililada. No entanto, esta mutação também resulta em um nível baixo de atividade da enzima glutamina sintetase. Esta deficiência foi suprimida pela adição de glutamina ao meio de cultura antes e durante a expressão das proteínas. As proteínas GlnB e GlnK nativas e GlnB mutantes foram superexpressas a partir do promotor *pT7*. A proteína GlnB foi superexpressa a partir do plasmídeo pEMB101.8, que contém o gene *glnB* inserido no vetor pET28b+. Este plasmídeo contém uma deleção na sequência que codifica para a cauda de histidinas do vetor pET28b+, e expressa a proteína GlnB na sua forma nativa (BENELLI et al. 2001). A proteína GlnK e as proteínas GlnB mutantes foram expressas a partir do vetor pET29a+. A proteína GlnK foi expressa a partir do plasmídeo pEMB200 e as proteínas GlnB G108A/P109A, GlnB G108W e GlnB

Q3R/T5A a partir dos plasmídeos pACB3, pACB71 e pACB61, respectivamente. O extrato de células obtido em cada ensaio de indução foi avaliado em SDS-PAGE para verificar o nível de expressão das proteínas (Figuras 6 a 10).

5.3. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae* E GlnB MUTANTES

As proteínas GlnB e GlnK nativas, e as proteínas GlnB G108A/P109A, GlnB G108W e GlnB Q3R/T5A foram purificadas utilizando uma coluna de troca iônica (Q-Sepharose) seguida de uma coluna de gel filtração (Superdex 75) (Figuras 11 e 12). Tanto as proteínas nativas quanto as mutantes apresentaram um padrão de eluição semelhante em ambas as colunas. A tabela 2 mostra o grau de pureza e o rendimento das proteínas GlnB e GlnK em cada etapa da purificação. O rendimento obtido para as proteínas GlnB mutantes não está mostrado na tabela mas foi semelhante à proteína GlnB nativa. Na coluna de troca iônica, o pico de eluição ocorreu na concentração aproximada de 400 mM de NaCl. Nesta etapa cromatográfica, várias frações que continham as proteínas PII com muitos contaminantes foram descartadas, o que resultou em um baixo rendimento. No entanto, esta etapa é essencial para purificar parcialmente as proteínas antes da injeção na coluna de gel filtração. Apesar das proteínas GlnB e GlnK apresentarem um padrão de eluição semelhante, o rendimento final da proteína GlnK foi aproximadamente duas vezes menor que o das proteínas GlnB nativa e mutantes. Após a primeira centrifugação, 81 % da proteína GlnB permaneceu na fração solúvel enquanto 64% da proteína GlnK foi encontrada nesta fração (Tabela 2). Além disso, na etapa de gel filtração, a recuperação da proteína GlnB foi de 76% enquanto a da proteína GlnK foi de 54%. Como em *E. coli*, a proteína GlnK desuridililada é sequestrada para a membrana através da ligação com a proteína AmtB (COUTTS et al. 2002; JAVELLE et al. 2004), é possível que parte da proteína GlnK de *H. seropedicae*, que na estirpe RB9065 λ DE3 é sintetizada na forma não uridililada, permaneça ligada à proteína AmtB. Neste caso, parte do complexo GlnK-AmtB pode ter permanecido na fração insolúvel. Além disso, na etapa de gel filtração, a parte do complexo GlnK-AmtB que permanecesse solúvel seria eluído no volume morto da coluna, contribuindo para a redução do rendimento de GlnK nesta etapa.

FIGURA 6 - INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *H. seropedicae* EM *E. coli* (RB9065 λ DE3)



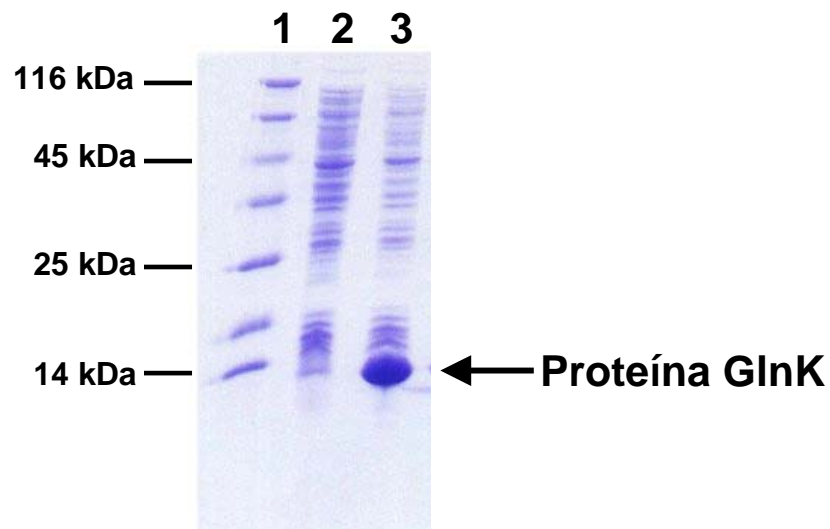
Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%) das proteínas presentes no extrato bruto de células de *E. coli* RB9065 λ DE3 transformadas com o plasmídeo pEMB101.8. A seta indica a banda correspondente à proteína GlnB superexpressa (12,27 kDa). As proteínas foram coradas com *coomassie blue*.

Linha 1 - marcador de massa molecular (Fermentas);

Linha 2 - extrato bruto de células sem indução (10 μ g);

Linha 3 - extrato bruto de células após 3 horas de indução com IPTG 0,5 mM (10 μ g).

FIGURA 7 - INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae* EM *E. coli* (RB9065 λ DE3)



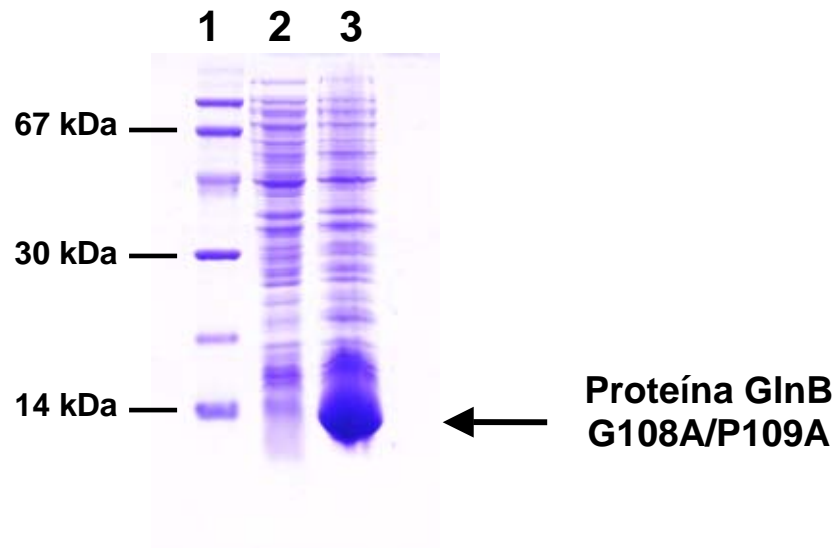
Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%) das proteínas presentes no extrato bruto de células de *E. coli* RB9065 λ DE3 transformadas com o plasmídeo pEMB200. A seta indica a banda correspondente à proteína GlnK superexpressa (12,21 kDa). As proteínas foram coradas com *coomassie blue*.

Linha 1 - marcador de massa molecular (Fermentas);

Linha 2 - extrato bruto de células sem indução (10 μ g);

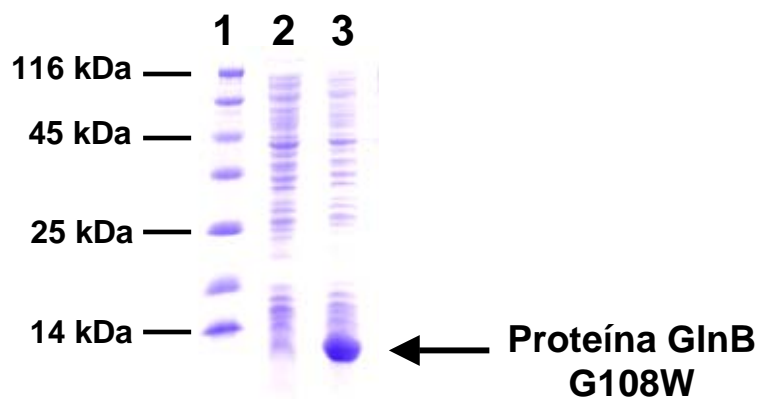
Linha 3 - extrato bruto de células após 3 horas de indução com IPTG 0,5 mM (10 μ g).

FIGURA 8 - INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MUTANTE GlnB G108A/P109A EM *E. coli* (RB9065 λ DE3)



Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%) das proteínas presentes no extrato bruto de células de *E. coli* RB9065 λ DE3 transformadas com o plasmídeo pACB3. A seta indica a banda correspondente à proteína GlnB G108A/P109A superexpressa (12,25 kDa). As proteínas foram coradas com *coomassie blue*.
Linha 1 - marcador de massa molecular (GE Healthcare);
Linha 2 - extrato bruto de células sem indução (10 μ g);
Linha 3 - extrato bruto de células após 3 horas de indução com IPTG 0,5 mM (10 μ g).

FIGURA 9 - INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MUTANTE GlnB G108W EM *E. coli* (RB9065 λ DE3)



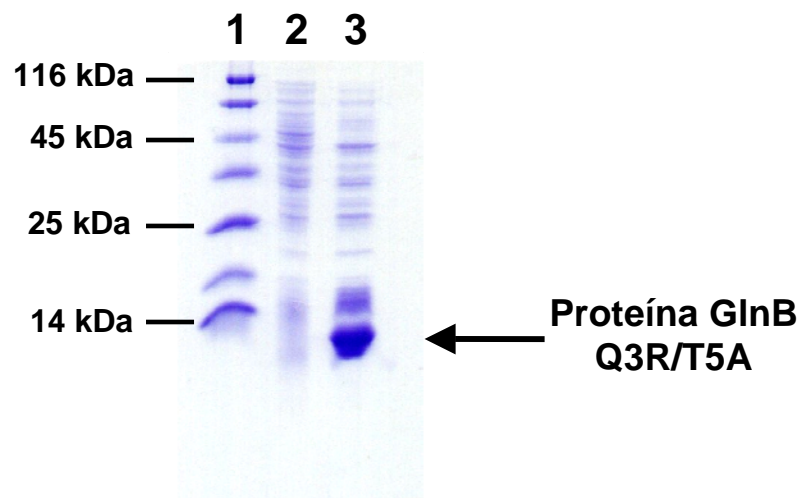
Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%) das proteínas presentes no extrato bruto de células de *E. coli* RB9065 λ DE3 transformadas com o plasmídeo pACB71. A seta indica a banda correspondente à proteína GlnB G108W superexpressa (12,39 kDa). As proteínas foram coradas com *coomassie blue*.

Linha 1 - marcador de massa molecular (Fermentas);

Linha 2 - extrato bruto de células sem indução (10 μ g);

Linha 3 - extrato bruto de células após 3 horas de indução com IPTG 0,5 mM (10 μ g).

FIGURA 10 - INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MUTANTE GlnB Q3R/T5A EM *E. coli* (RB9065 λ DE3)

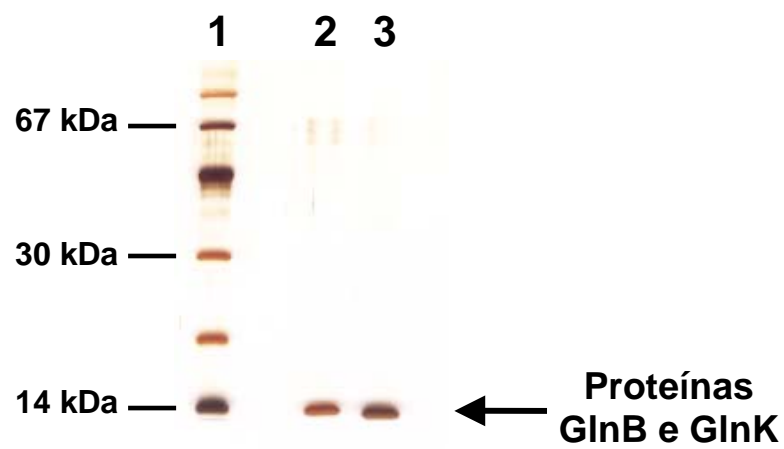


Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%) das proteínas presentes no extrato bruto de células de *E. coli* RB9065 λ DE3 transformadas com o plasmídeo pACB61. A seta indica a banda correspondente à proteína GlnB Q3R/T5A superexpressa (12,28 kDa). As proteínas foram coradas com *coomassie blue*.

Linha 1 - marcador de massa molecular (Fermentas);

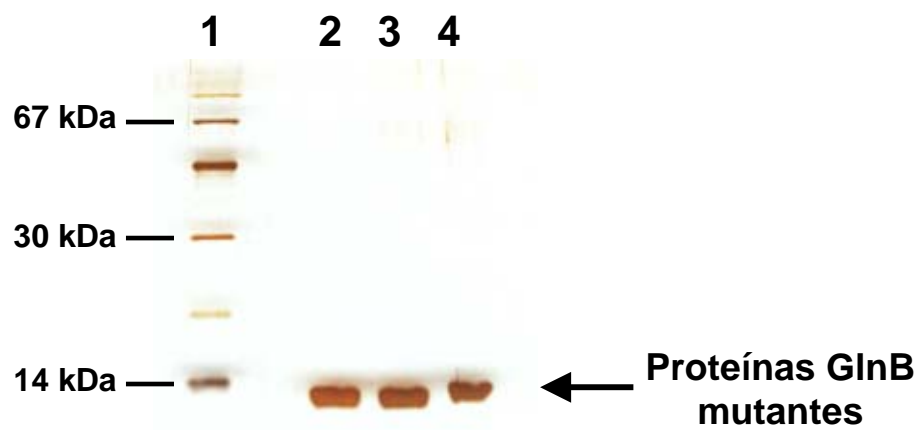
Linha 2 - extrato bruto de células sem indução (10 μ g);

Linha 3 - extrato bruto de células após 3 horas de indução com IPTG 0,5 mM (10 μ g).

FIGURA 11 - PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae* PURIFICADAS

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%) com as proteínas PII de *H. seropedicae* após as duas etapas de purificação (troca iônica e gel filtração) e diálise em tampão A contendo glicerol 50%. As proteínas foram coradas com prata.
Linha 1 - Marcador de massa molecular (GE Healthcare);
Linha 2 - Proteína GlnB de *H. seropedicae* (200 ng);
Linha 3 - Proteína GlnK de *H. seropedicae* (200 ng).

FIGURA 12 - PROTEÍNAS MUTANTES GlnB G108A/P109A, GlnB G108W E GlnB Q3R/T5A PURIFICADAS



Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%) com as proteínas GlnB mutantes de *H. seropedicae* após as duas etapas de purificação (troca iônica e gel filtração) e diálise em tampão A contendo glicerol 50%. As proteínas foram coradas com prata.

Linha 1 – Marcador de massa molecular (GE Healthcare);

Linha 2 – Proteína mutante GlnB G108A/P109A (200 ng);

Linha 3 – Proteína mutante GlnB GlnB G108W (200 ng);

Linha 4 – Proteína mutante GlnB Q3R/T5A (200 ng).

TABELA 2 – PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae*.

GlnB				
Etapa de purificação	Proteína total (mg)	GlnB (mg)	Rendimento (%)	Pureza (%)
Extrato bruto de <i>E. coli</i>	110	31	100	28
Fração solúvel	62	25	81	40
Sulfato de estreptomicina	55	23	74	42
Troca iônica	14	8	26	58
Gel filtração	6.5	6.1	20	94

GlnK				
Etapa de purificação	Proteína total (mg)	GlnK (mg)	Rendimento (%)	Pureza (%)
Extrato bruto de <i>E. coli</i>	112	33	100	30
Fração solúvel	53	21	64	40
Sulfato de estreptomicina	49	20	61	41
Troca iônica	10	5.5	17	55
Gel filtração	3.2	3	9	95

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976). A pureza foi determinada por análise densitométrica de amostras das etapas de purificação aplicadas em gel de acrilamida 15% e coradas com Coomassie blue R250. O rendimento foi calculado como a quantidade de proteína obtida em cada etapa em relação à quantidade inicial.

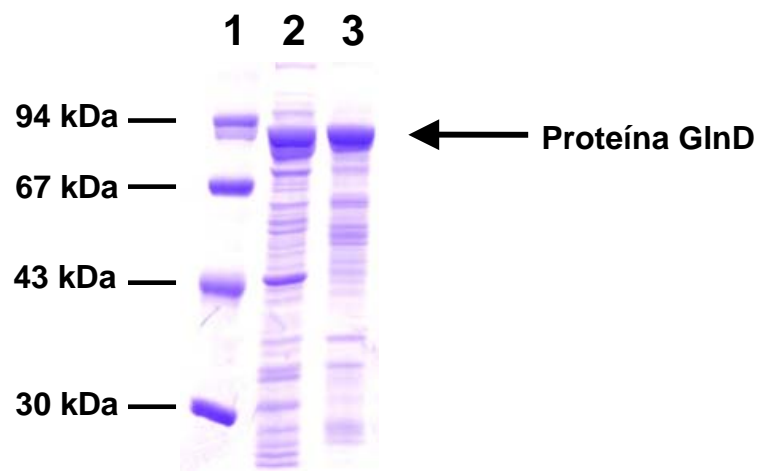
5.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae*

A proteína GlnD de *H. seropedicae* foi superexpressa em células de *E. coli* estirpe RB9065λDE3 (*glnB⁻/glnD⁻*), a partir do plasmídeo pGH2, que contém o gene *glnD* inserido no vetor pET29a+. Após a indução, uma alíquota das células foi utilizada para verificar o nível de expressão da proteína GlnD em gel SDS-PAGE (Figura 13). A banda correspondente a proteína GlnD foi quantificada por densitometria e aproximadamente 50% da proteína foi detectada na fração solúvel.

5.5. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae*

A proteína GlnD de *H. seropedicae* foi purificada parcialmente por COUTO (2005) utilizando uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose. No presente trabalho, a proteína GlnD foi purificada em duas etapas: coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose) e coluna de afinidade (Agarose-Heparina) (Figura 14). Na coluna de troca iônica, a eluição ocorreu aproximadamente entre 300 e 400 mM de NaCl e na coluna de afinidade em aproximadamente 600 mM de NaCl. Apesar da baixa solubilidade observada para a proteína GlnD (COUTO, 2005), cerca de 64% desta proteína permaneceu na fração solúvel do extrato (Tabela 3). Na etapa de cromatografia de troca iônica o rendimento de GlnD foi inferior ao observado para as proteínas PII. Apesar do baixo rendimento, este passo foi essencial para a obtenção de um maior grau de pureza de GlnD na etapa de cromatografia de afinidade em coluna de heparina.

FIGURA 13 - INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae* EM *E. coli* (RB9065 λ DE3)

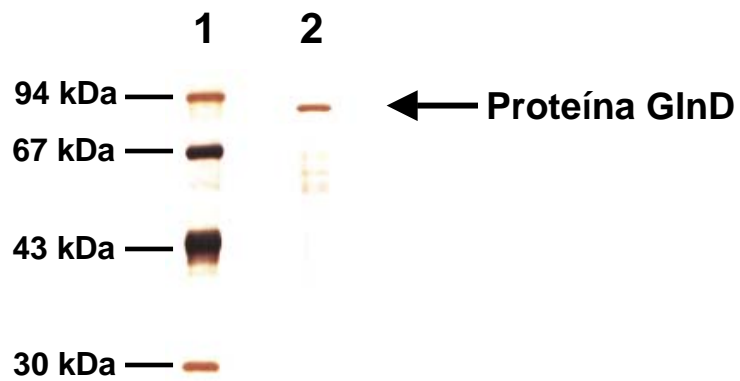


Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (10%) das proteínas presentes no extrato bruto de células de *E. coli* RB9065 λ DE3 transformadas com o plasmídeo pGH2. A seta indica a banda correspondente à proteína GlnD superexpressa (97 kDa). As proteínas foram coradas com *coomassie blue*.

Linha 1 - marcador de massa molecular (GE Healthcare);

Linha 2 - fração solúvel do extrato de células após 4 horas de indução com IPTG 0,5 mM (10 μ g);

Linha 3 - fração insolúvel do extrato de células após 4 horas de indução com IPTG 0,5 mM (10 μ g).

FIGURA 14 - PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae* PURIFICADA

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (10%) com a proteína GlnD de *H. seropedicae* após as duas etapas de purificação (troca iônica e afinidade) e diálise em tampão C contendo glicerol 50%. As proteínas foram coradas com prata.

Linha 1 – Marcador de massa molecular (GE Healthcare);

Linha 2 – Proteína GlnD purificada (200 ng).

TABELA 3 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae*

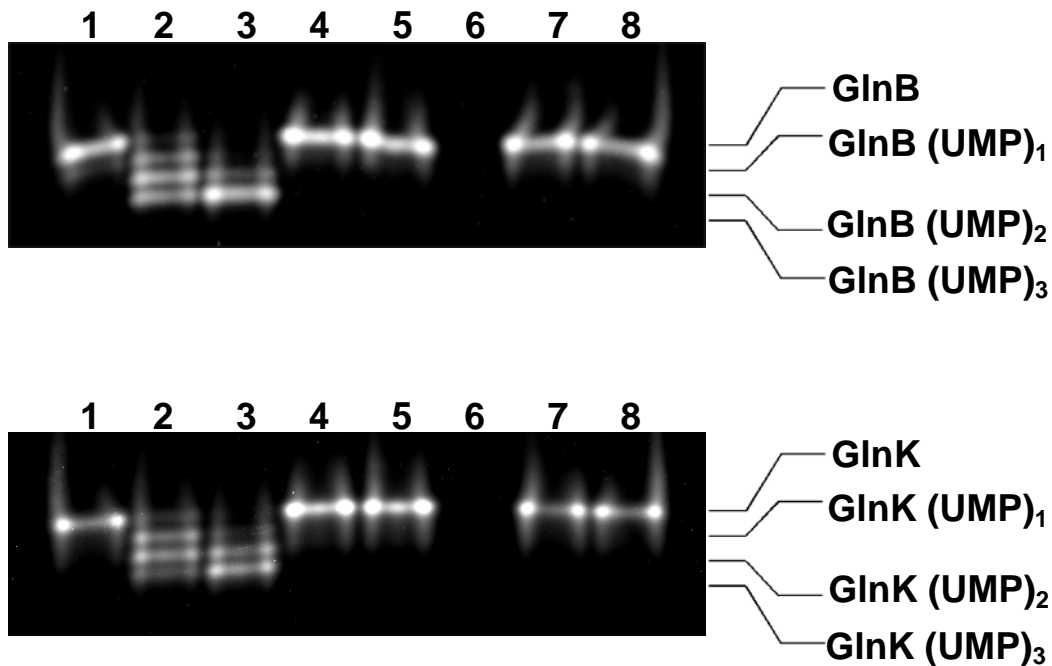
GlnD				
Etapa de purificação	Proteína total (mg)	GlnD (mg)	Rendimento (%)	Pureza (%)
Extrato bruto de <i>E. coli</i>	72	14	100	20
Fração solúvel	31	9	64	30
Sulfato de estreptomicina	29	9	64	31
Troca iônica	3.2	1.2	9	38
Afinidade (Heparina)	0.7	0.6	4	85

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976). A pureza foi determinada por análise densitométrica das amostras das etapas de purificação aplicadas em gel de acrilamida 10% e coradas com Coomassie blue R250. O rendimento foi calculado como a quantidade de proteína obtida em cada etapa em relação à quantidade inicial.

5.6. URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *H. seropedicae*

As proteínas GlnB, GlnK e GlnB mutantes e a enzima GlnD purificadas foram utilizadas em ensaios de uridililação *in vitro*. Além das proteínas purificadas, a reação de uridililação continha UTP, o segundo substrato da reação, e as moléculas efetoras ATP e 2-oxoglutarato. As reações foram iniciadas pela adição de UTP e interrompidas pela adição de tampão contendo EDTA. Os perfis de uridililação das proteínas PII foram avaliados em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. As proteínas PII purificadas apresentam apenas uma banda no gel nativo, que corresponde à forma não modificada. Quando as proteínas PII são uridililadas, a migração destas proteínas no gel é mais rápida quanto maior for o número de monômeros uridililados. Desta forma, quatro bandas podem ser visualizadas: PII, PII-(UMP)₁, PII-(UMP)₂ e PII-(UMP)₃.

O perfil de uridililação das proteínas GlnB e GlnK é mostrado na Figura 15. Diferentes reações contendo as proteínas GlnB ou GlnK foram aplicadas em géis nativos. A reação completa continha ATP (200 µM), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 µM de PII e 50 ou 100 nM de GlnD. No tempo zero desta reação apenas uma banda de PII foi observada, correspondente à forma não uridililada. Quando a reação foi incubada na ausência de GlnD ou UTP também foi observada apenas a forma não modificada de PII. Por outro lado, as três formas uridililadas de GlnB e GlnK foram visualizadas quando a mistura completa de reação foi incubada por 10 minutos. Estes resultados indicam que as proteínas PII de *H. seropedicae* podem ser uridililadas *in vitro* pela proteína GlnD de *H. seropedicae*. A quantificação das bandas correspondentes às diferentes formas das proteínas PII mostrou para a proteína GlnB uma porcentagem de uridililação de 60% e 86% de uridililação na presença de 50 nM e 100 nM de GlnD, respectivamente, enquanto para GlnK, a porcentagem de uridililação foi de 52% e 67% nas mesmas condições. Estes resultados indicam que a uridililação de GlnB foi mais eficiente do que GlnK nestas condições, diferente do observado para as proteínas PII de *E. coli*, onde a proteína GlnK é uridililada quase com a mesma eficiência que GlnB (ATKINSON & NINFA, 1999). Na ausência de um dos efetores ATP ou 2-oxoglutarato, nenhuma uridililação das PII de *H. seropedicae* foi observada (Figura 15), sugerindo que a presença de ambos os efetores é necessária para a uridililação destas proteínas.

FIGURA 15 - PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae*

O sistema de reação completo continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M das proteínas GlnB ou GlnK e 50 ou 100 nM da proteína GlnD. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen).

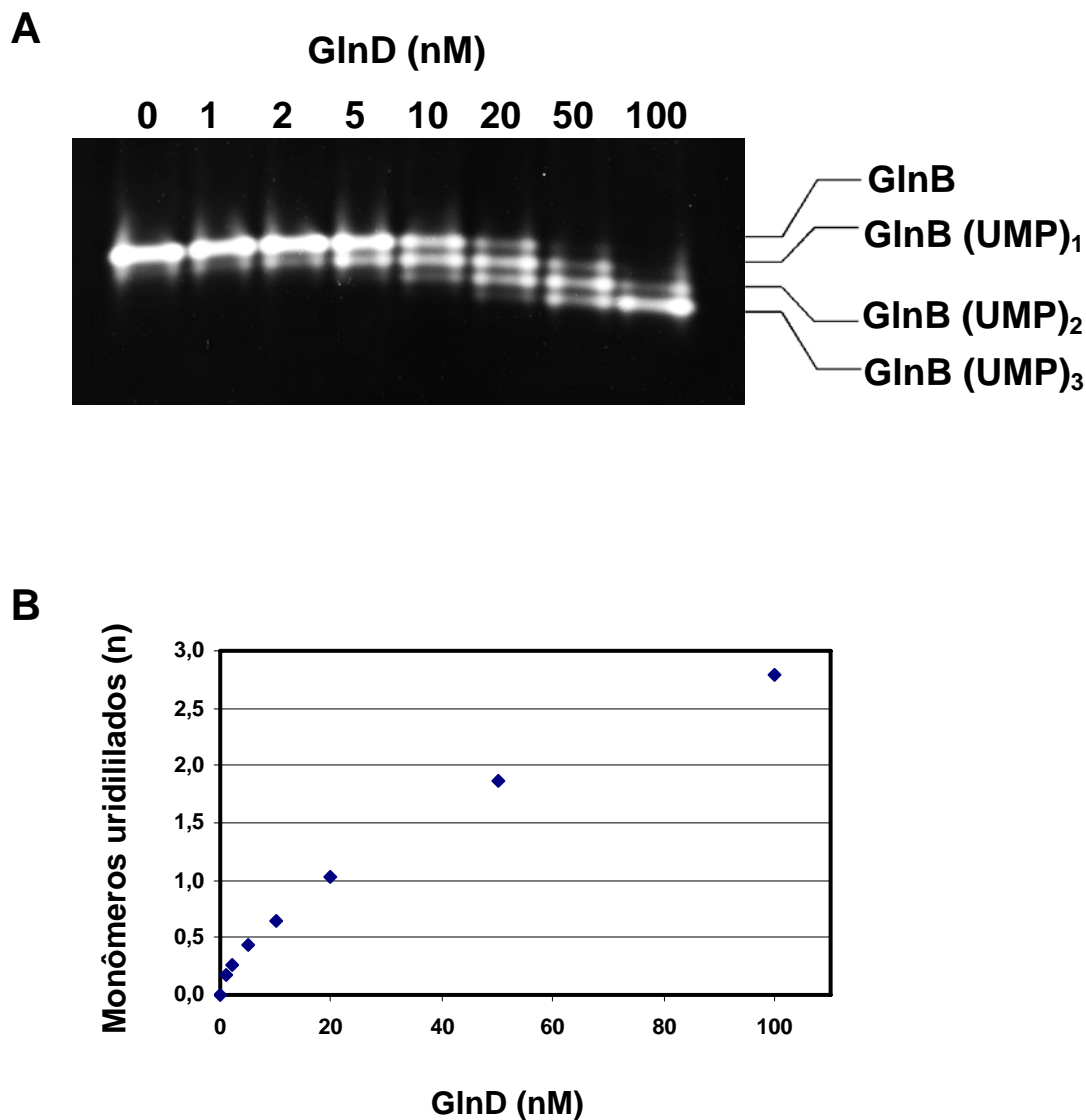
- Linha 1 – Reação de uridilação completa (100 nM de GlnD; 0 minutos);
- Linha 2 – Reação de uridilação completa (50 nM de GlnD; 10 minutos);
- Linha 3 – Reação de uridilação completa (100 nM de GlnD; 10 minutos);
- Linha 4 – Reação de uridilação sem UTP;
- Linha 5 – Reação de uridilação sem proteína GlnD;
- Linha 6 – Reação de uridilação sem proteína GlnB ou GlnK;
- Linha 7 – Reação de uridilação sem ATP;
- Linha 8 – Reação de uridilação sem 2-oxoglutarato.

5.6.1. Efeito da Concentração de GlnD na Uridililação das Proteínas PII de *H. seropedicae*

O efeito da concentração da proteína GlnD sobre a uridililação das proteínas PII de *H. seropedicae* foi avaliado em reações contendo diferentes quantidades da enzima. Os perfis de uridililação das proteínas GlnB e GlnK em resposta às diferentes concentrações de GlnD testadas foram observados em géis de eletroforese nativa (Figuras 16A e 17A). As bandas visualizadas nos géis foram quantificadas e o número de monômeros uridililados foi calculado para cada reação. Estes dados foram utilizados para construir os gráficos de relação entre a concentração de enzima e o número de monômeros uridililados das proteínas GlnB e GlnK (figuras 16B e 17B). Os gráficos mostram que o aumento da concentração de GlnD provoca um aumento na uridililação das proteínas PII.

A comparação entre as figuras 16 e 17 mostra novamente uma diferença na taxa de uridililação entre as proteínas GlnB e GlnK, que foi maior para a proteína GlnB.

FIGURA 16 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GlnD SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *H. seropedicae*

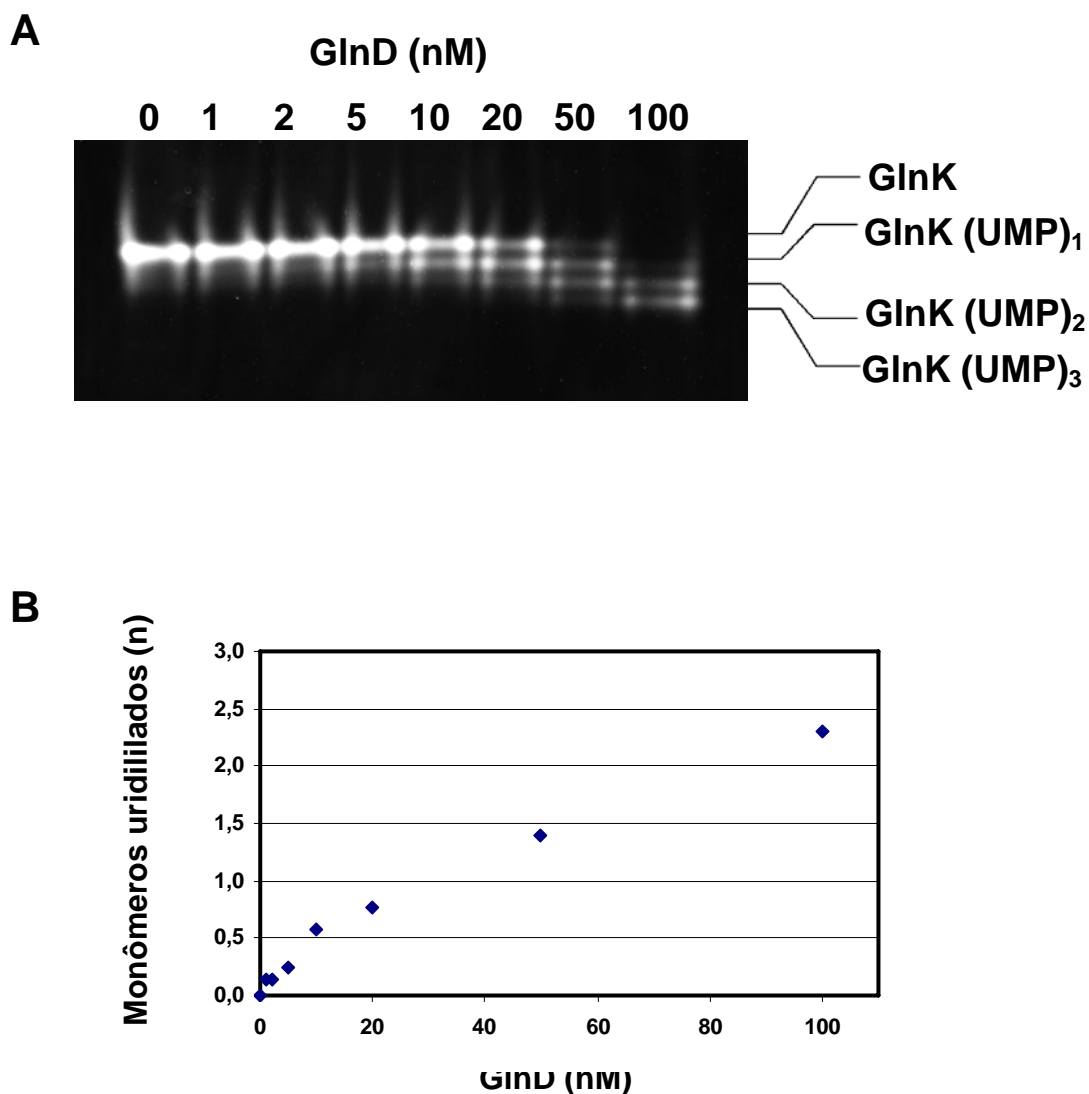


O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M da proteína GlnB e 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 ou 100 nM da proteína GlnD.

A, Eletroforese em gel nativo 7,5%. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen). Linhas 1 a 8 – Reação de uridililação da proteína GlnB de *H. seropedicae* com diferentes concentrações da enzima GlnD após 10 minutos de incubação.

B, Relação entre a concentração da enzima GlnD e a uridililação da proteína GlnB de *H. seropedicae*. O número de monômeros uridilados foi calculado a partir da quantificação das bandas observadas no gel nativo utilizando a fórmula mostrada no item 4.14.1.

FIGURA 17 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GlnD SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae*



O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M da proteína GlnK e 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 ou 100 nM da proteína GlnD.

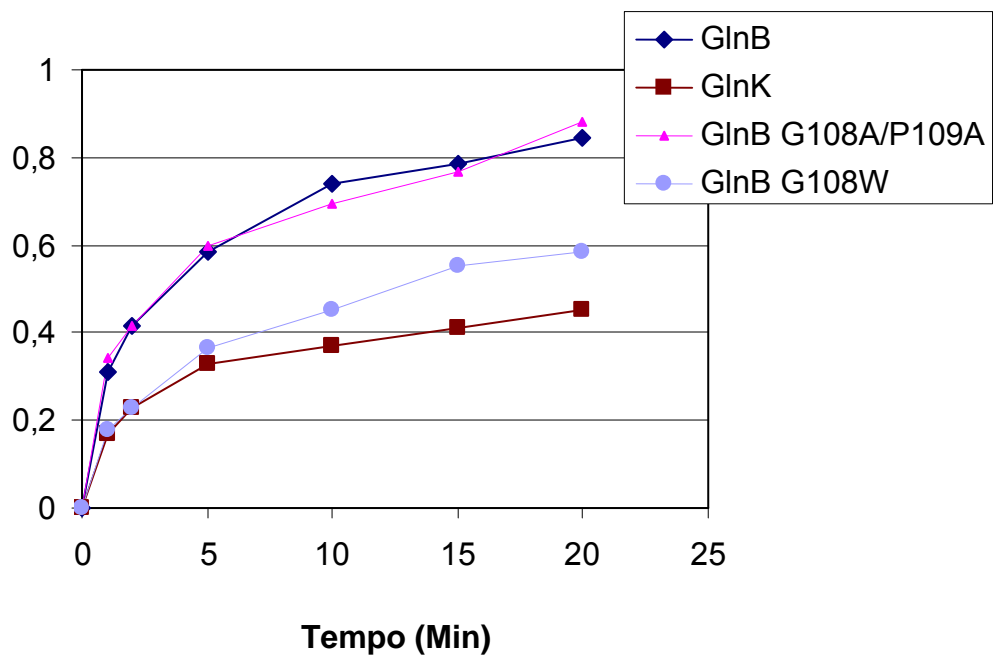
A, Eletroforese em gel nativo 7,5%. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen). Linhas 1 a 8 – Reação de uridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* com diferentes concentrações da enzima GlnD após 10 minutos de incubação.

B, Relação entre a concentração da enzima GlnD e a uridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae*. O número de monômeros uridilados foi calculado a partir da quantificação das bandas observadas no gel nativo utilizando a fórmula mostrada no item 4.14.1.

5.6.2. Efeito do Tempo de Reação na Uridililação das Proteínas PII de *H. seropedicae*

A linearidade da uridililação das proteínas PII ao longo do tempo de reação foi avaliada seguindo a mudança no perfil de uridililação durante o curso da reação. As reações com as proteínas GlnB, GlnK, GlnB G108A/P109A e GlnB G108W conduzidas em diferentes períodos de incubação foram avaliadas por eletroforese em gel nativo. As bandas correspondentes aos diferentes estados de uridililação das proteínas PII foram quantificadas por densitometria. As quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular o número de monômeros uridililados em cada ensaio. A figura 18 mostra um gráfico da relação entre o tempo de incubação e o número de monômeros uridililados para cada proteína PII. Os resultados indicam que a uridililação das proteínas PII é aproximadamente linear nos primeiros dois minutos de reação. Após 20 minutos de reação, a taxa de uridililação da proteína GlnB G108A/P109A (0,88 monômeros uridililados) foi similar a proteína GlnB nativa (0,85), enquanto a proteína mutante GlnB G108W (0,58) foi similar a proteína GlnK (0,45). Estes resultados sugerem que a proteína mutante GlnB G108W responde à uridililação pela proteína GlnD de forma semelhante à proteína GlnK.

FIGURA 18 – EFEITO DO TEMPO NO PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae* E GlnB MUTANTES



O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M das proteínas GlnB, GlnK ou GlnB mutantes e 10 nM da proteína GlnD. As reações foram incubadas durante 0, 1, 2, 5, 10, 15 ou 20 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridilados (0 a 3). Os resultados representam a média de três experimentos com desvio menor que 20%.

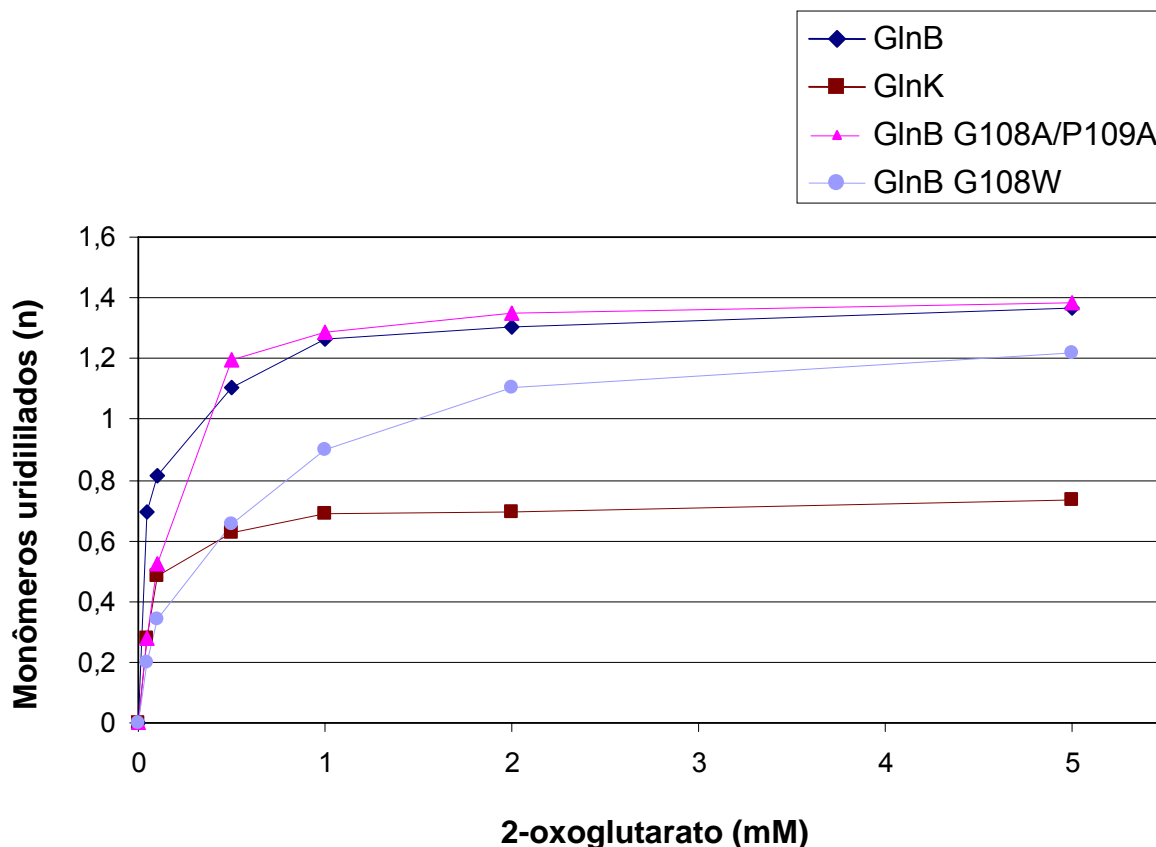
5.6.3. Efeito da Concentração dos Efetores 2-oxoglutarato e ATP na Uridililação das Proteínas PII de *H. seropedicae*

Em *E. coli*, as moléculas 2-oxoglutarato e ATP ligam-se diretamente às proteínas PII e são essenciais para as reações de uridililação e desuridililação (KAMBEROV et al. 1995; JIANG et al. 1998a; ATKINSON & NINFA, 1999). O efeito da concentração de 2-oxoglutarato e ATP na uridililação das proteínas PII de *H. seropedicae* foi avaliado em reações contendo diferentes concentrações destes efetores. Na ausência destas moléculas nenhuma das proteínas PII testadas foi uridililada (Figuras 19 e 20). A taxa de uridililação das proteínas PII aumenta com o aumento da concentração dos efetores. O valor máximo de uridililação foi observado na presença de 2 mM de 2-oxoglutarato (Figura 19) e 200 μ M de ATP (Figura 20).

5.6.4. Efeito da Concentração das Moléculas ADP e AMP na Uridililação das Proteínas PII de *H. seropedicae*

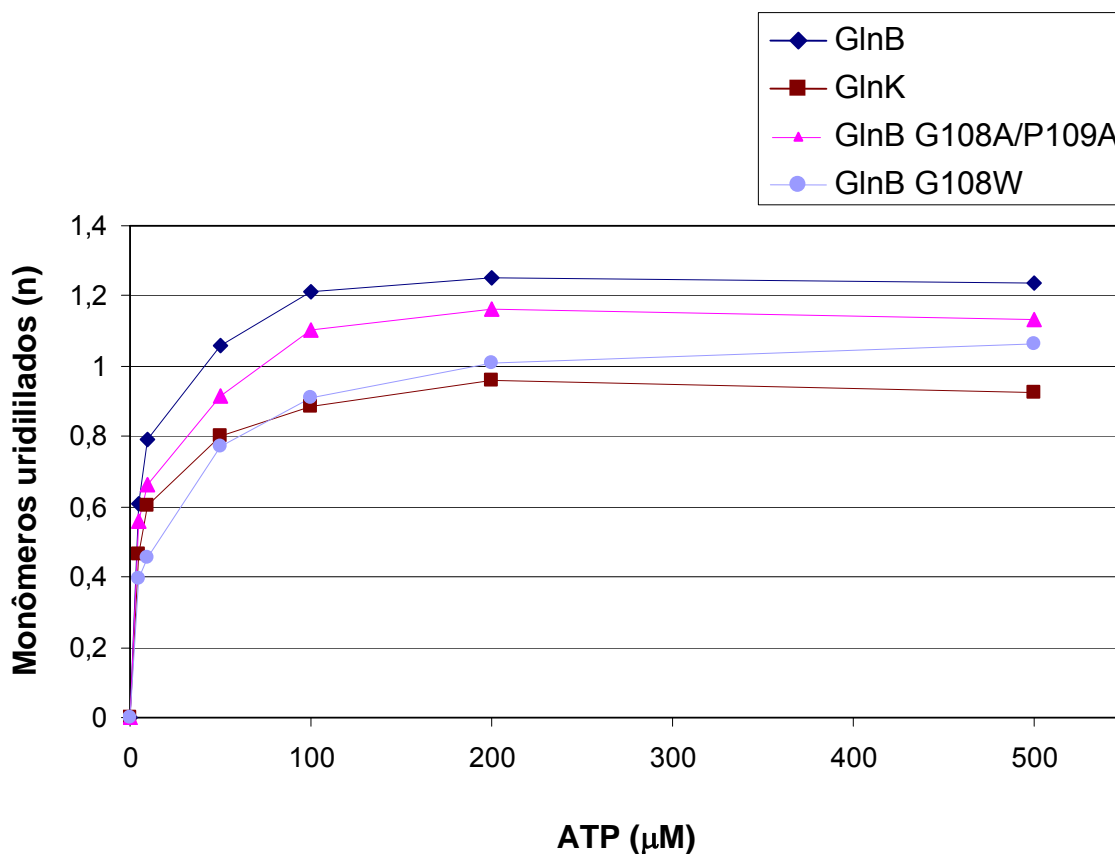
O efeito das moléculas ADP e AMP na uridililação das proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* foi avaliado através de reações contendo diferentes concentrações destes efetores. As maiores taxas de uridililação foram observadas na concentração de 200 μ M dos 3 efetores. Comparando os resultados obtidos para a concentração de 200 μ M, a proteína GlnB apresentou média de 2,6, 2,3 e 0,6 monômeros uridililados na presença de ATP, ADP e AMP, respectivamente (Figura 21). A média de monômeros uridililados da proteína GlnK foi 2,2, 2,1 e 1,3 na presença de ATP, ADP e AMP, respectivamente (Figura 22). Estes resultados sugerem que a uridililação da proteína GlnB tem maior especificidade por ATP. Em contraste, a taxa de uridililação da proteína GlnK na presença de ADP correspondeu a 96% da observada com ATP, sugerindo que a molécula de ADP possa atuar como efetor da uridililação da proteína GlnK com a mesma eficiência que o ATP.

FIGURA 19 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OXOGLUTARATO NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae* E GlnB MUTANTES



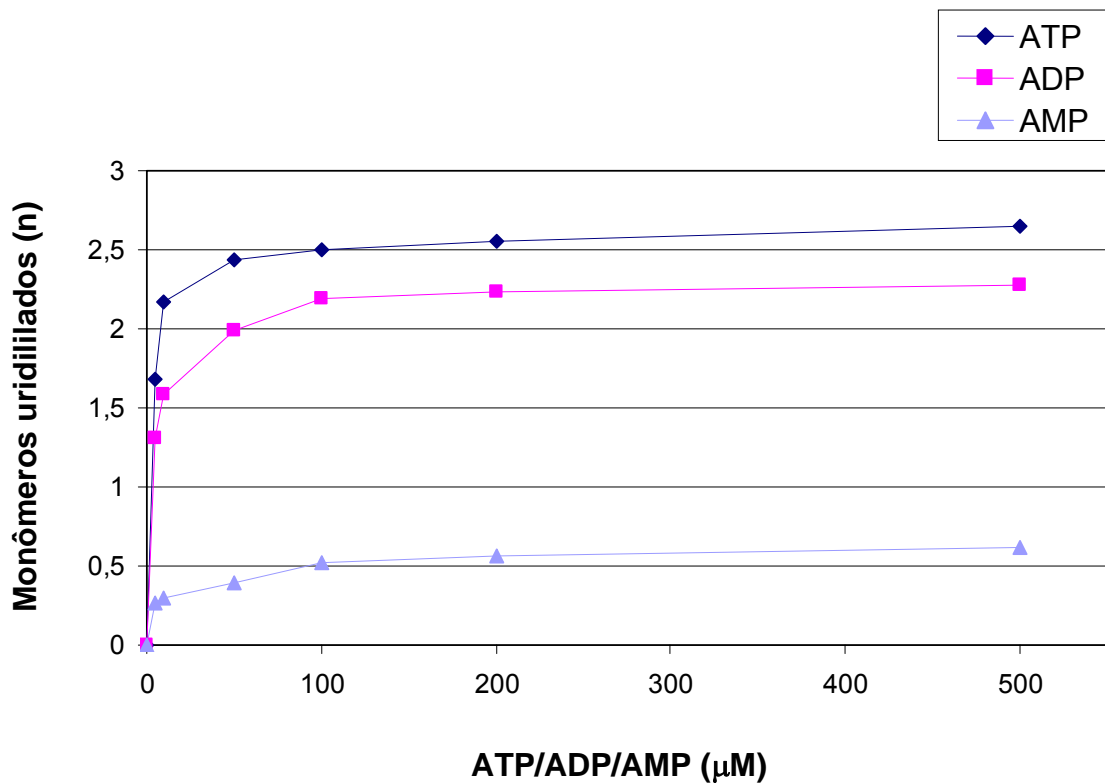
O sistema de reação continha ATP (200 μ M), UTP (1 mM), 2 μ M das proteínas GlnB, GlnK ou GlnB mutantes, 50 nM da proteína GlnD e 0, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2 ou 5 mM de 2-oxoglutarato. As reações foram incubadas durante 5 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos três experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo.

FIGURA 20 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae* E GlnB MUTANTES



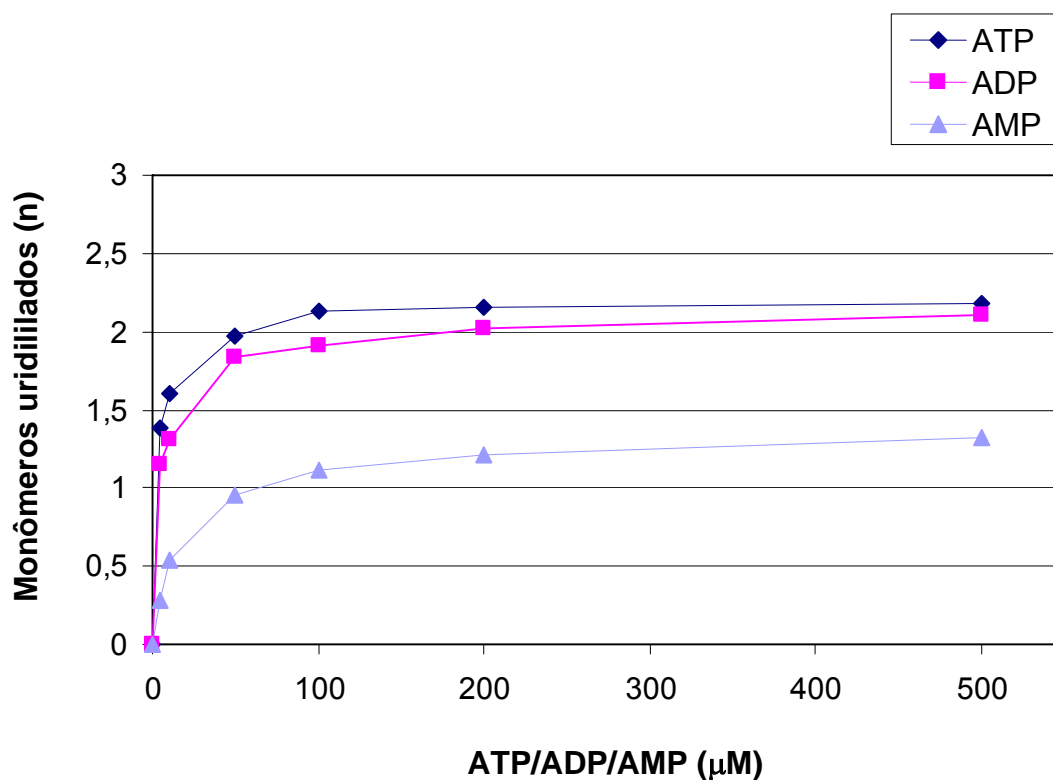
O sistema de reação continha 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μM das proteínas GlnB, GlnK ou GlnB mutantes, 50 nM da proteína GlnD e 0, 5, 10, 50, 100, 200 ou 500 μM de ATP. As reações foram incubadas durante 5 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos três experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo.

FIGURA 21 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ADP E AMP NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *H. seropedicae*



O sistema de reação continha 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μM da proteína GlnB, 100 nM da proteína GlnD e 0, 5, 10, 50, 100, 200 ou 500 μM de AMP, ADP ou ATP. As reações foram incubadas durante 10 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos três experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo.

FIGURA 22 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ADP E AMP NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae*

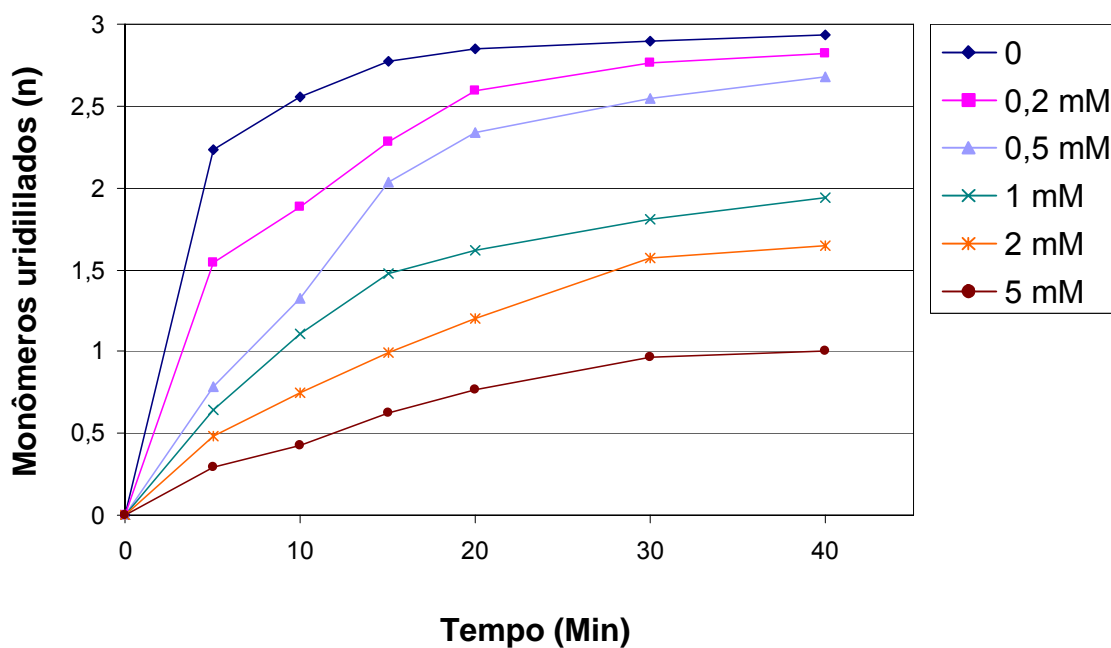


O sistema de reação continha 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μM da proteína GlnK, 100 nM da proteína GlnD e 0, 5, 10, 50, 100, 200 ou 500 μM de AMP, ADP ou ATP. As reações foram incubadas durante 10 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos três experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo.

5.6.5. Efeito da Concentração de Glutamina na Uridililação das Proteínas PII de *H. seropedicae*

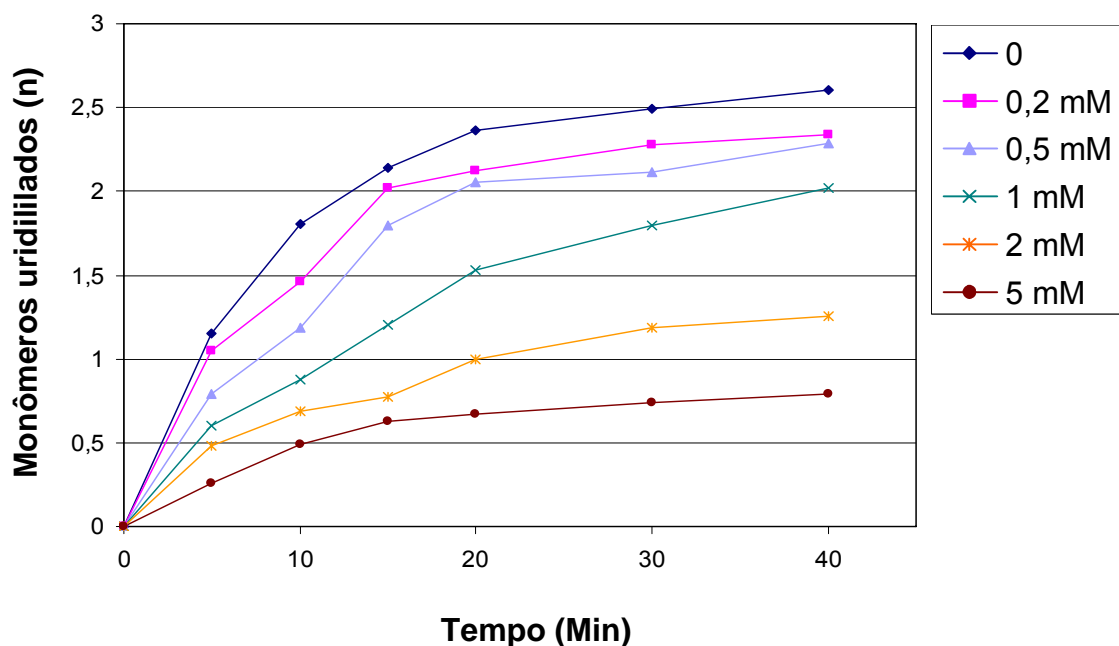
Estudos cinéticos realizados com a proteína GlnB de *E. coli*, indicaram que a glutamina liga-se ao complexo GlnB-GlnD inibindo a reação de uridililação (JIANG et al. 1998a). O efeito da concentração de glutamina sobre a reação de uridililação das proteínas PII de *H. seropedicae* foi avaliado usando diferentes concentrações desta molécula em diferentes tempos de incubação. Para todas as proteínas testadas, a uridililação foi inibida por glutamina de uma maneira concentração-dependente (Figuras 23 a 26). Na maior concentração de glutamina testada (5 mM), a inibição da uridililação foi de 65% para a proteína GlnB e 70% para a proteína GlnK em relação à atividade na ausência do inibidor, sugerindo que as proteínas GlnB e GlnK apresentam um perfil similar de inibição por glutamina.

Os padrões apresentados pelas proteínas GlnB mutantes neste ensaio são semelhantes aos observados em outras condições, onde a proteína GlnB G108W apresenta um perfil de uridililação mais próximo ao da proteína GlnK (Figuras 23 a 26).

FIGURA 23 - EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *H. seropedicae*

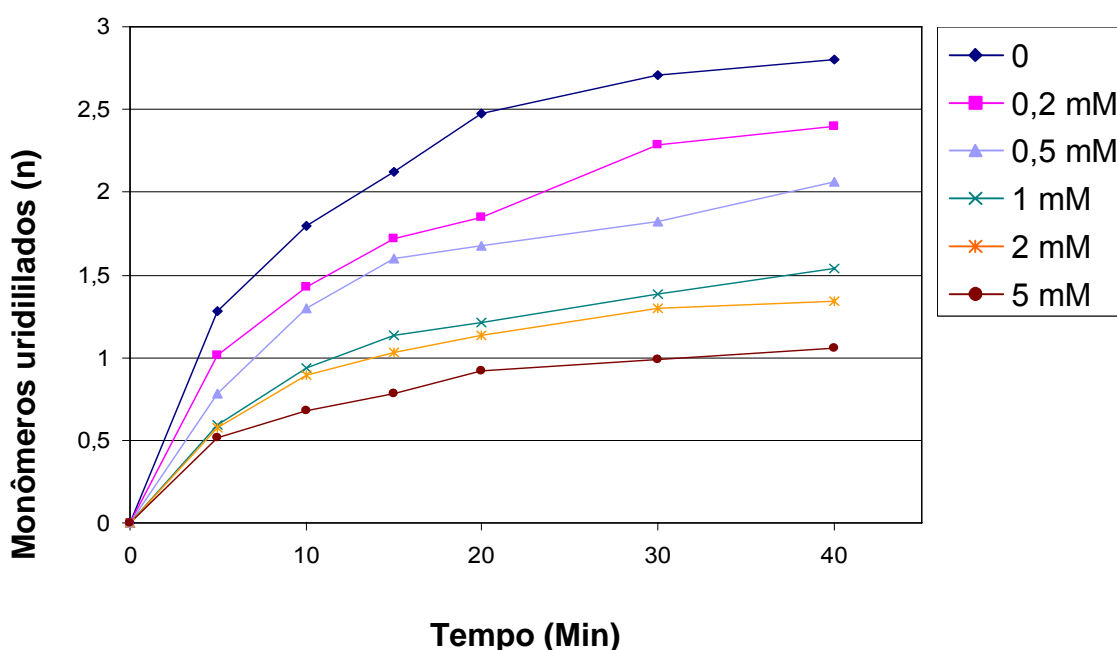
O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M da proteína GlnB, 100 nM da proteína GlnD e glutamina nas concentrações indicadas. As reações foram incubadas durante 0, 5, 10, 15, 20, 30 ou 40 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos dois experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo. A legenda do gráfico indica a concentração de glutamina usada em cada ensaio.

FIGURA 24 - EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE *H. seropedicae*

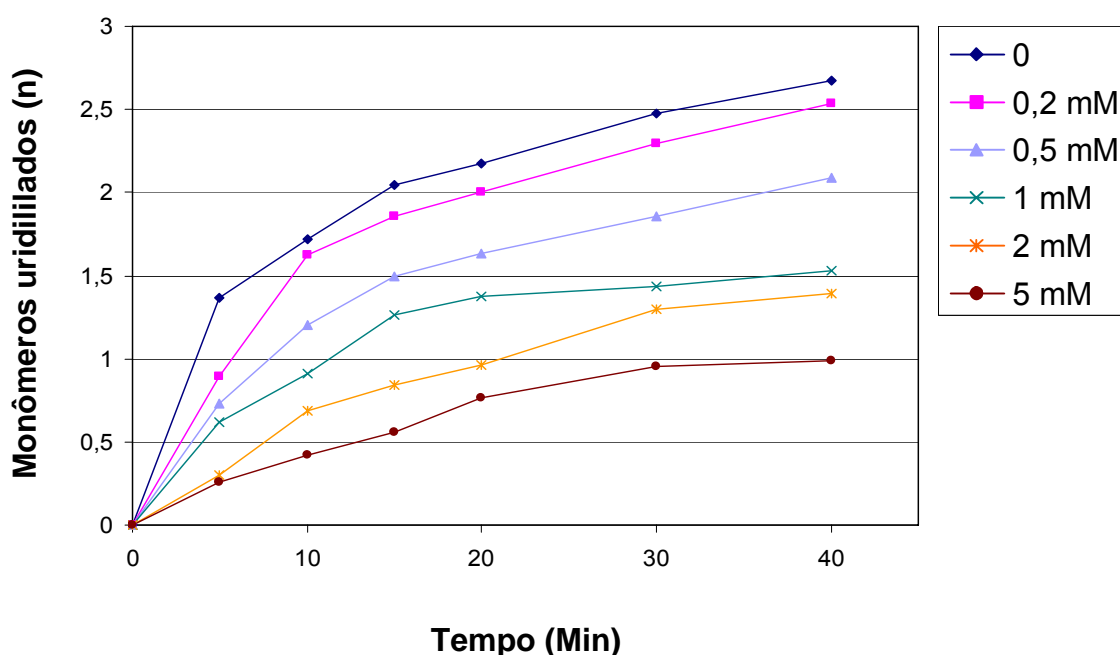


O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M da proteína GlnK, 100 nM da proteína GlnD e glutamina nas concentrações indicadas. As reações foram incubadas durante 0, 5, 10, 15, 20, 30 ou 40 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos dois experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo. A legenda do gráfico indica a concentração de glutamina usada em cada ensaio.

FIGURA 25 - EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB G108A/P109A DE *H. seropedicae*



O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M da proteína GlnB G108A/P109A, 100 nM da proteína GlnD e glutamina nas concentrações indicadas. As reações foram incubadas durante 0, 5, 10, 15, 20, 30 ou 40 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos dois experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo. A legenda do gráfico indica a concentração de glutamina usada em cada ensaio.

FIGURA 26 - EFEITO DA GLUTAMINA SOBRE A URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB G108W DE *H. seropedicae*

O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M da proteína GlnB G108W, 100 nM da proteína GlnD e glutamina nas concentrações indicadas. As reações foram incubadas durante 0, 5, 10, 15, 20, 30 ou 40 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos dois experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo. A legenda do gráfico indica a concentração de glutamina usada em cada ensaio.

5.6.6. Perfil de Uridililação da Proteína Mutante GlnB Q3R/T5A

A proteína mutante GlnB Q3R/T5A foi expressa e purificada como as outras proteínas GlnB e nenhuma diferença foi observada entre esta mutante e as demais, tanto nas corridas em géis desnaturantes (SDS-PAGE) como durante o processo de purificação. No entanto, esta proteína apresentou um padrão de migração distorcido nos géis nativos que impossibilitou a visualização das diferentes formas uridililadas desta proteína. Vários testes foram realizados para identificar o motivo deste comportamento da proteína. O primeiro teste foi verificar se a proteína estava sofrendo degradação. A proteína GlnB Q3R/T5A foi purificada novamente, a partir de um novo extrato, mas as alíquotas testadas apresentaram o mesmo padrão nos géis nativos. A dosagem de proteína nas alíquotas de GlnB Q3R/T5A purificada antes e depois da diálise mostrou que não houve perda de proteína nesta etapa. O efeito dos componentes da reação de uridililação sobre a migração da proteína GlnB Q3R/T5A também foi avaliado utilizando o sistema completo ou na ausência de cada um dos componentes (ATP, 2-oxoglutarato, UTP e GlnD). A concentração de Tris e o tipo de sal também foram alterados na composição do tampão de uridililação, mas nenhuma destas modificações melhorou o perfil de migração da proteína GlnB Q3R/T5A. Mesmo quando aplicada no gel nativo misturada apenas com glicerol ou com tampão de amostra, esta proteína apresentou um perfil de migração distorcido sem bandas definidas. Desta forma, o perfil de uridililação da proteína GlnB Q3R/T5A foi avaliado em gel desnaturante usado para proteínas de baixa massa molecular.

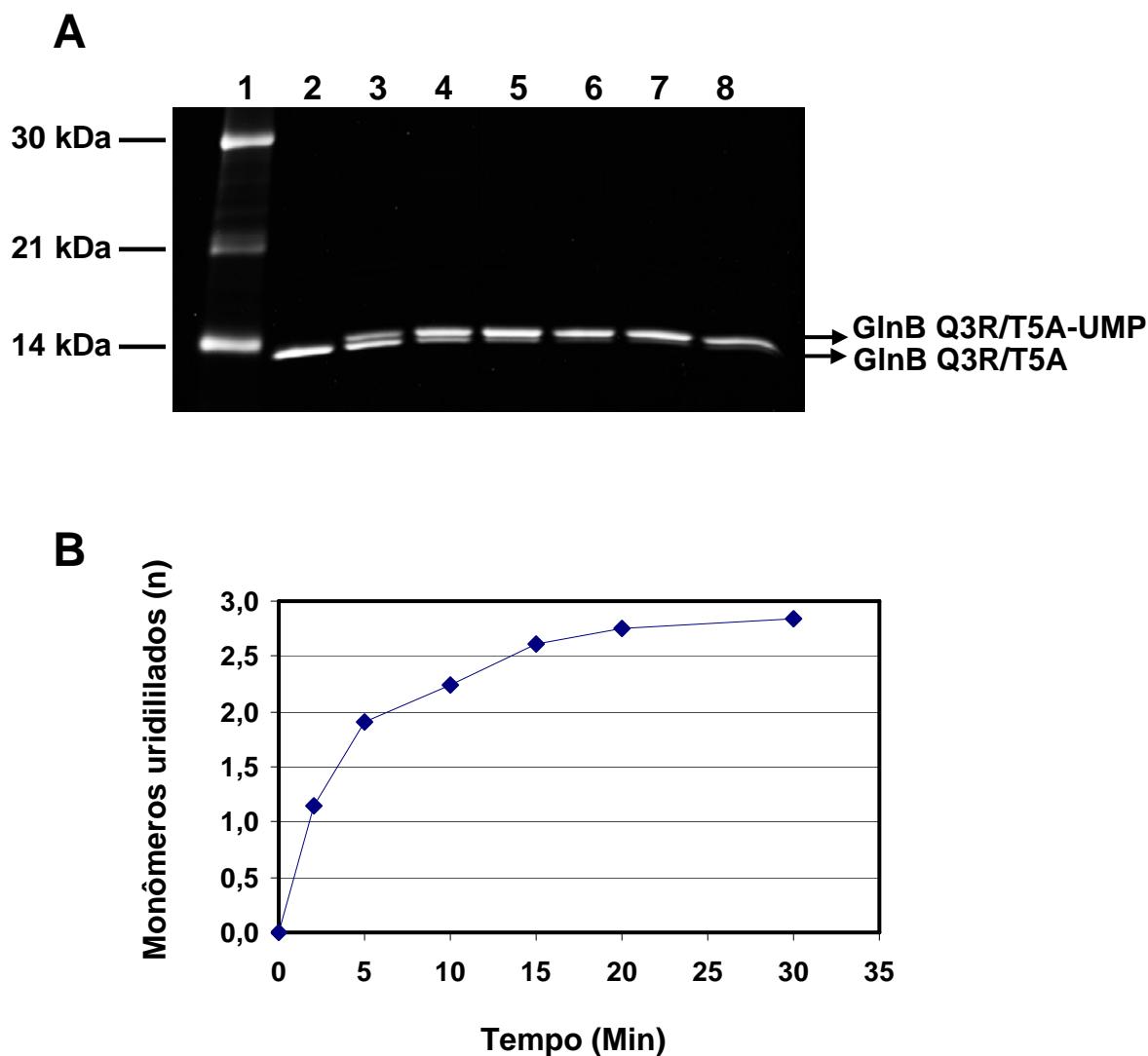
Na eletroforese desnaturante duas bandas podem ser visualizadas, uma correspondente ao monômero não modificado e outra ao monômero uridililado. A banda modificada migra mais lentamente devido ao acréscimo do UMP ao monômero da proteína. O perfil de uridililação da proteína GlnB Q3R/T5A foi avaliado em diferentes tempos de incubação da reação (Figura 27A). As bandas visualizadas no gel foram quantificadas e utilizadas para calcular o número de monômeros uridililados para cada tempo de incubação (Figura 27B). Após 30 minutos de reação, a proteína GlnB Q3R/T5A apresentou 2,8 monômeros uridililados. Este número é similar ao observado para a proteína GlnB nativa em um ensaio sob as mesmas condições (2,87 monômeros, Figura 28). Estes resultados

sugerem que a proteína mutante GlnB Q3R/T5A possui um perfil de uridililação similar a proteína GlnB nativa.

5.7. DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *H. seropedicae*

A proteína GlnD é uma enzima bifuncional com capacidade de uridililar e desuridililar as proteínas PII. A atividade removedora de uridilil da enzima GlnD de *H. seropedicae* foi avaliada em ensaios de desuridililação com as proteínas GlnB e GlnK. Inicialmente, as proteínas PII foram uridililadas em uma reação que continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarate (500 μ M), UTP (1 mM), 2 μ M de PII e 100 nM de GlnD. Após inativação do sistema de uridililação, as proteínas PII foram desuridililadas em presença de ATP ou ADP (200 μ M), 2-oxoglutarate (300 μ M), glutamina (5 mM), 2 μ M de PII-UMP e GlnD variando de 0 a 2 μ M. As figuras 29 e 30 mostram o perfil de desuridililação das proteínas GlnB e GlnK na presença de ATP ou ADP. Na presença de ATP, o número de monômeros uridililados das proteínas GlnB e GlnK reduziu de 3 para 1,4 e 1,6, respectivamente, enquanto na presença de ADP a redução de GlnB foi de 3 para 2,5 e GlnK para 2,8. Estes resultados indicam que a desuridililação de ambas as proteínas é mais eficiente com ATP do que com ADP (Figura 31). A taxa de desuridililação da proteína GlnK (45%) foi próxima à taxa de GlnB (52%) na presença de ATP, sugerindo que em *H. seropedicae* a desuridililação de GlnK é quase tão eficiente quanto a de GlnB.

FIGURA 27 - EFEITO DO TEMPO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB Q3R/T5A DE *H. seropedicae*



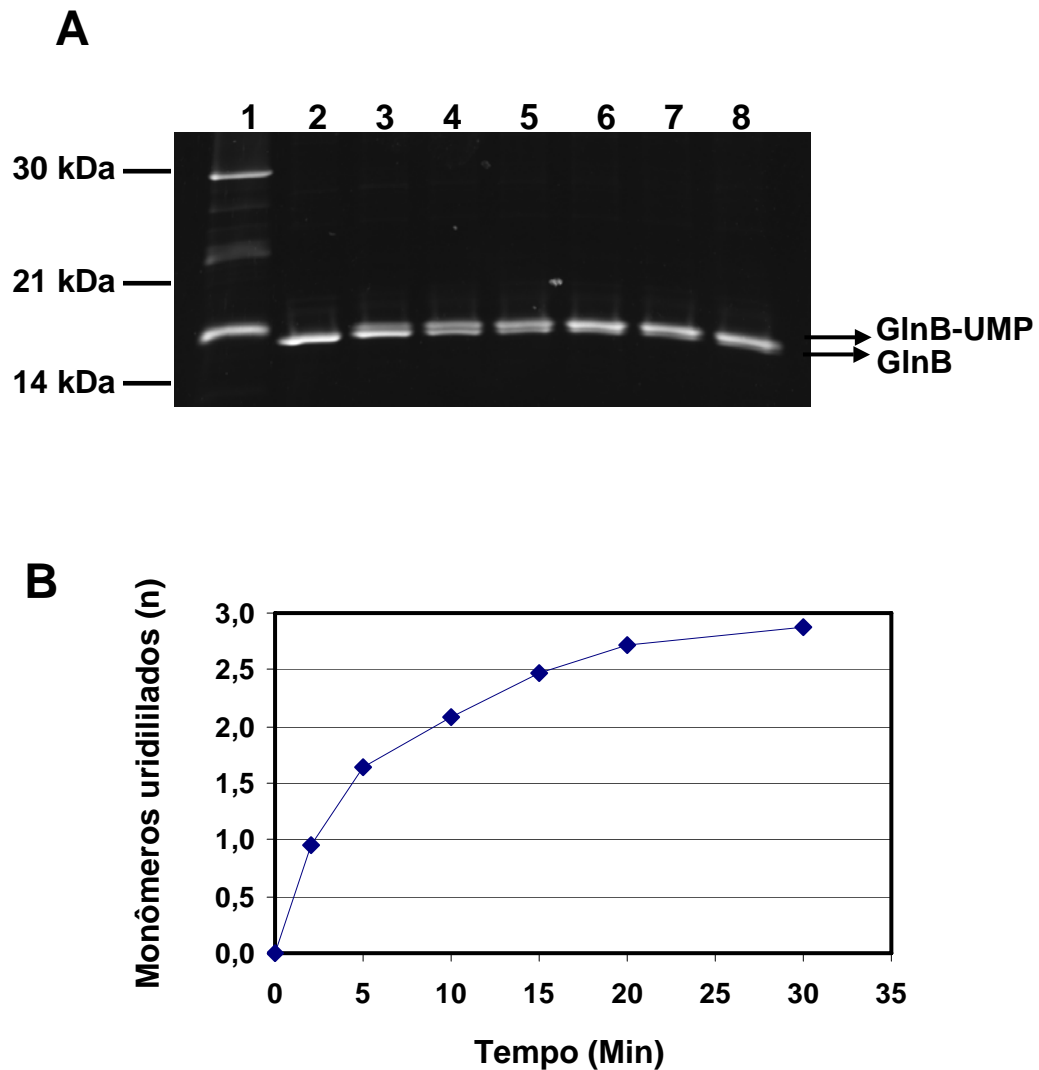
O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M da proteína Q3R/T5A e 100 nM da proteína GlnD. As reações foram incubadas durante 0, 2, 5, 10, 15, 20 ou 30 minutos.

A, Eletroforese em gel desnaturante (15%) para proteínas de baixa massa molecular. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen).

Linha 1 – Marcador de massa molecular (GE Healthcare);

Linhas 2 a 8 – Reação de uridililação da proteína GlnB Q3R/T5A em diferentes tempos de incubação.

B, Relação entre o tempo de incubação e a uridililação da proteína GlnB Q3R/T5A. O número de monômeros uridilados foi calculado a partir da quantificação das bandas observadas no gel desnaturante.

FIGURA 28 - EFEITO DO TEMPO NA URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *H. seropedicae*

O sistema de reação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (5 mM), UTP (1 mM), 2 μ M da proteína GlnB e 100 nM da proteína GlnD. As reações foram incubadas durante 0, 2, 5, 10, 15, 20 ou 30 minutos.

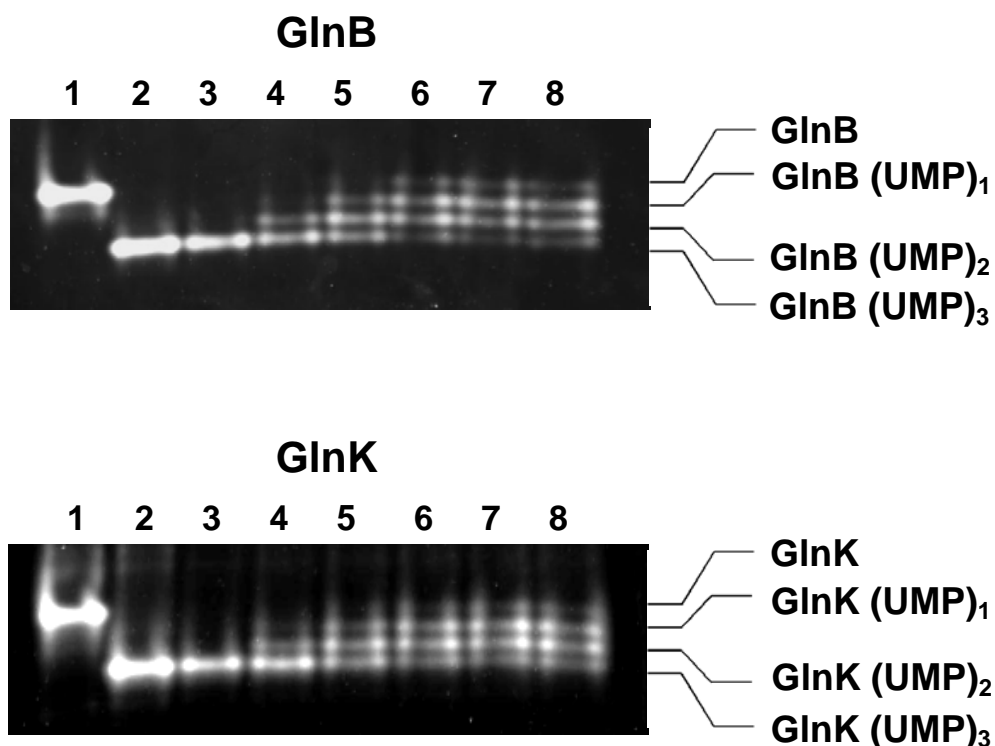
A, Eletroforese em gel desnaturante (15%) para proteínas de baixa massa molecular. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen).

Linha 1 – Marcador de massa molecular (GE Healthcare);

Linhas 2 a 8 – Reação de uridililação da proteína GlnB em diferentes tempos de incubação.

B, Relação entre o tempo de incubação e a uridililação da proteína GlnB. O número de monômeros uridilados foi calculado a partir da quantificação das bandas observadas no gel desnaturante.

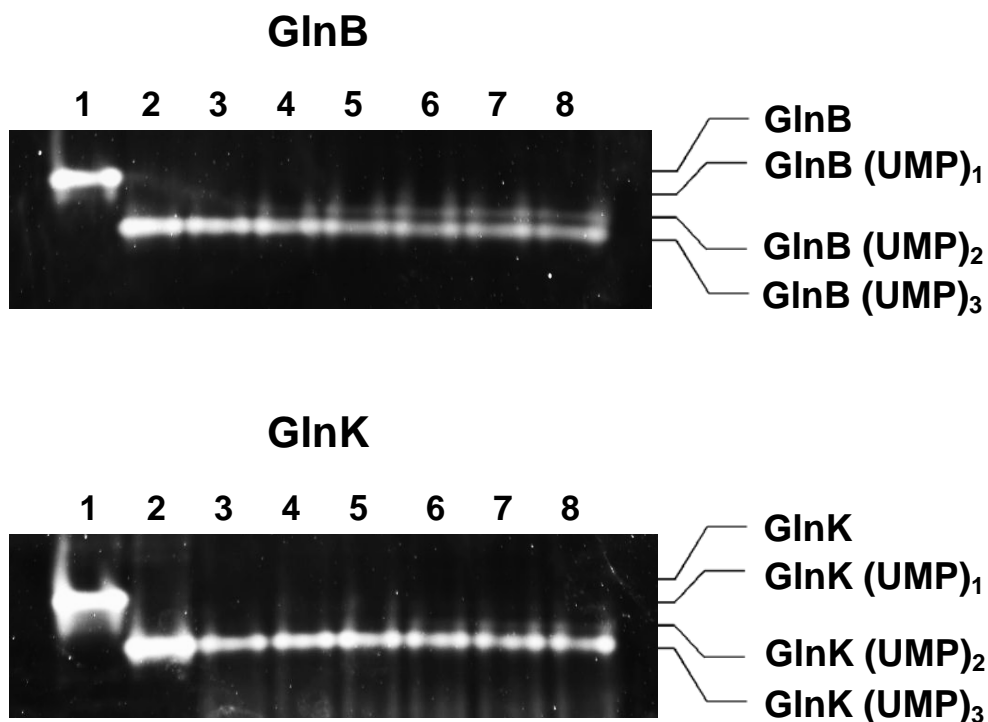
FIGURA 29 - EFEITO DO ATP NA DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae*



O sistema de reação de uridililação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (500 μ M), UTP (1 mM), 2 μ M das proteínas GlnB ou GlnK e 100 nM da proteína GlnD. O sistema de desuridililação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (300 μ M), glutamina (5 mM), 2 μ M das proteínas GlnB ou GlnK e 0, 200, 500, 1000, 1500 ou 2000 nM da proteína GlnD e foi incubado durante 40 minutos. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen).

- Linha 1 – Reação de uridililação (0 minutos);
- Linha 2 – Reação de uridililação (60 minutos);
- Linha 3 – Reação de desuridililação (0 nM de GlnD);
- Linha 4 – Reação de desuridililação (200 nM de GlnD);
- Linha 5 – Reação de desuridililação (500 nM de GlnD);
- Linha 6 – Reação de desuridililação (1000 nM de GlnD);
- Linha 7 – Reação de desuridililação (1500 nM de GlnD);
- Linha 8 – Reação de desuridililação (2000 nM de GlnD).

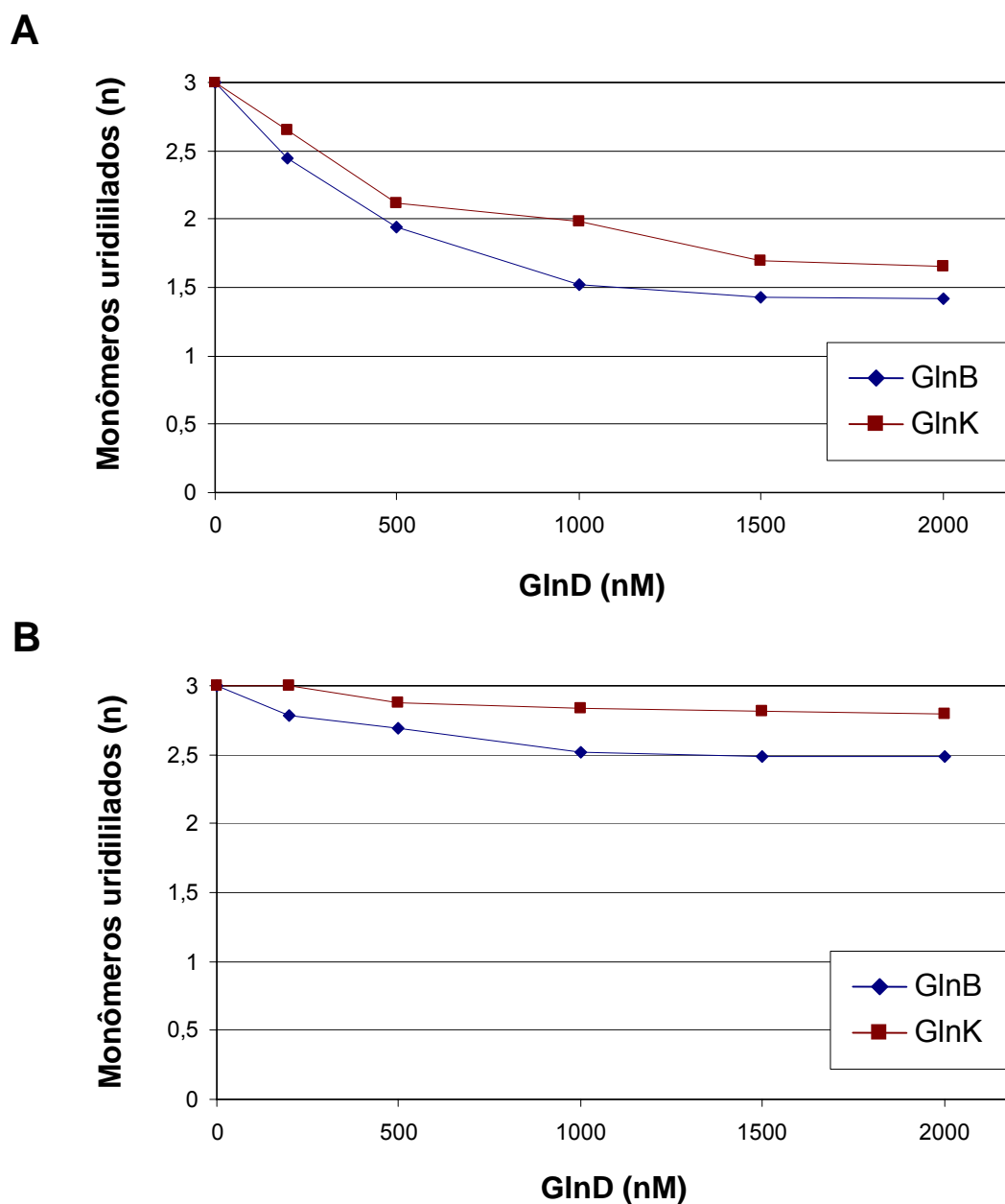
FIGURA 30 - EFEITO DO ADP NA DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae*



O sistema de reação de uridilação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (500 μ M), UTP (1 mM), 2 μ M das proteínas GlnB ou GlnK e 100 nM da proteína GlnD. O sistema de desuridilação continha ADP (200 μ M), 2-oxoglutarato (300 μ M), glutamina (5 mM), 2 μ M das proteínas GlnB ou GlnK e 0, 200, 500, 1000, 1500 ou 2000 nM da proteína GlnD e foi incubado durante 40 minutos. As proteínas foram coradas com SyPro Ruby (Invitrogen).

- Linha 1 – Reação de uridilação (0 minutos);
- Linha 2 – Reação de uridilação (60 minutos);
- Linha 3 – Reação de desuridilação (0 nM de GlnD);
- Linha 4 – Reação de desuridilação (200 nM de GlnD);
- Linha 5 – Reação de desuridilação (500 nM de GlnD);
- Linha 6 – Reação de desuridilação (1000 nM de GlnD);
- Linha 7 – Reação de desuridilação (1500 nM de GlnD);
- Linha 8 – Reação de desuridilação (2000 nM de GlnD).

FIGURA 31 – EFEITO DO ADP E DO ATP NA DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae*



O sistema de reação de uridililação continha ATP (200 μ M), 2-oxoglutarato (500 μ M), UTP (1 mM), 2 μ M das proteínas GlnB ou GlnK e 100 nM da proteína GlnD e foi incubado por 60 minutos. O sistema de desuridililação continha ATP (**A**) ou ADP (**B**) (200 μ M), 2-oxoglutarato (300 μ M), glutamina (5 mM), 2 μ M das proteínas GlnB ou GlnK e 0, 200, 500, 1000, 1500 ou 2000 nM da proteína GlnD e foi incubado durante 40 minutos e aplicadas em gel de eletroforese nativa. As proteínas foram coradas e quantificadas, e as quantidades relativas observadas para cada banda foram utilizadas para calcular a quantidade de monômeros uridililados (0 a 3). Esta análise foi realizada em pelo menos dois experimentos independentes e os resultados correspondem a um experimento representativo.

6. DISCUSSÃO

As proteínas do tipo PII estão envolvidas com o processamento e transmissão dos sinais de nitrogênio, carbono e energia para outras proteínas envolvidas no metabolismo de nitrogênio. Na maioria das proteobactérias, as proteínas GlnB e GlnK sofrem modificação covalente pela proteína GlnD em resposta aos níveis de nitrogênio celular. Esta modificação é um dos fatores que determina como e com quais alvos as proteínas PII interagem na célula. Neste trabalho, as proteínas GlnB, GlnK, GlnB mutantes e GlnD de *H. seropedicae* foram purificadas em sua forma nativa em dois passos cromatográficos. Os protocolos utilizados para purificar estas proteínas foram mais simples e rápidos que os protocolos usados para a purificação das proteínas PII e GlnD de *E. coli* (KAMBEROV et al. 1994a). As proteínas purificadas de *H. seropedicae* apresentaram graus de pureza similares aos obtidos para as proteínas de *E. coli* e os ensaios de uridililação mostraram que estas proteínas foram purificadas em sua forma ativa.

Em muitas bactérias, as proteínas PII sofrem modificação pós-traducional através de uridililação/desuridililação. Este mecanismo foi estudado mais detalhadamente em *E. coli* (ENGLEMAN & FRANCIS, 1978; FRANCIS & ENGLEMAN, 1978; KAMBEROV et al. 1994a; KAMBEROV et al. 1995; JIANG et al. 1998a; ATKINSON & NINFA, 1999). As proteínas PII de *H. seropedicae* e de *E. coli* apresentam alta homologia e a proteína GlnB de *H. seropedicae* também é estruturalmente semelhante às proteínas PII de *E. coli* (BENELLI et al. 2002b). A capacidade das proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* e GlnB mutantes de serem modificadas pela proteína GlnD foi avaliada. Os resultados mostraram que as proteínas PII de *H. seropedicae* são uridililadas e desuridililadas pela proteína GlnD *in vitro*. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho indicaram que existem diferenças no perfil de uridililação/desuridililação das proteínas PII de *H. seropedicae* e *E. coli*. Em ambos os organismos, a uridililação da proteína GlnB é mais eficiente que a proteína GlnK, no entanto, em *H. seropedicae* esta diferença é mais acentuada. Em contraste, a taxa de desuridililação da proteína GlnK de *E. coli* é cerca de dez vezes menor que GlnB, enquanto em *H. seropedicae* a desuridililação de GlnK foi similar a de GlnB. O padrão de inibição por glutamina observado para as

proteínas PII de *H. seropedicae* também difere do observado para as proteínas PII de *E. coli*. Em *H. seropedicae* as proteínas GlnB e GlnK apresentam um perfil similar de inibição por glutamina, enquanto em *E. coli*, a inibição por glutamina é maior para GlnB do que para GlnK.

As proteínas PII de *H. seropedicae* e de *E. coli* também apresentam aspectos em comum quanto ao mecanismo de uridililação/desuridililação. A reação de uridililação das proteínas PII de *H. seropedicae* foi linear apenas na fase inicial, similar ao observado para a proteína GlnB de *E. coli*. Estudos cinéticos mostraram que GlnB-UMP é um inibidor competitivo de GlnB (JIANG et al. 1998a) e esta inibição provavelmente é um dos fatores que diminui a velocidade da reação. As proteínas PII de *H. seropedicae* não foram uridililadas na ausência dos efetores ATP e 2-oxoglutarato. Estes resultados também foram observados para as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* (KAMBEROV et al. 1995; ATKINSON & NINFA, 1999). BENELLI et al. (2001) observaram uridililação da proteína GlnB de *H. seropedicae* na ausência de ATP, 2-oxoglutarato ou ambos. No entanto, estas reações foram feitas com a proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada ou com extratos celulares de *H. seropedicae*, que poderiam conter estes efetores.

ADP e AMP foram capazes de promover a uridililação das proteínas PII de *H. seropedicae*. Em *E. coli*, estas moléculas também foram capazes de substituir o ATP na reação de uridililação de GlnB, porém com menor eficiência (BROWN et al. 1971). A taxa de uridililação da proteína GlnB de *E. coli* com ADP e AMP correspondeu a 67% e 10% respectivamente, em relação à obtida com ATP. Para a proteína GlnB de *H. seropedicae* os resultados foram similares e na presença de ADP e AMP, a taxa de uridililação correspondeu a 88% e 23% da taxa observada na presença de ATP. Por outro lado, a uridililação da proteína GlnK de *H. seropedicae* parece ocorrer com a mesma eficiência na presença de ADP ou ATP. Estes resultados sugerem que tanto ADP como ATP poderiam atuar como efetores da reação de uridililação de GlnK e que esta proteína pode ser menos sensível do que GlnB às mudanças dos níveis energéticos da célula. Recentemente, a estrutura tridimensional do complexo GlnK-AmtB de *E. coli* foi determinada e os autores identificaram uma molécula de ADP ligada a proteína GlnK (CONROY et al. 2007; GRUSWITZ et al. 2007). Os autores destes trabalhos sugeriram tratar-se de uma

molécula de ATP hidrolisada, mas não excluem a possibilidade de que a molécula de ADP poderia estar ligada a GlnK desde a formação do complexo.

A atividade de remoção do grupo uridilil pela proteína GlnD de *H. seropedicae* também foi avaliada. Os resultados mostraram que na reação de desuridililação, tanto para GlnB como para GlnK, o ATP é mais eficiente como efector do que o ADP. Mesmo utilizando concentrações elevadas da enzima GlnD, as proteínas GlnB e GlnK não foram totalmente desuridililadas. As proteínas PII de *E. coli* também apresentam uma baixa taxa de desuridililação *in vitro*, mesmo em condições de excesso de enzima (JIANG et al. 1998a; ATKINSON & NINFA, 1999). JIANG et al. (1998a) sugeriram que além do ATP e 2-oxoglutarato presentes na reação, a atividade removedora de uridilil de GlnD poderia ser estimulada por alguma outra molécula ativadora. Os autores testaram uma série de compostos, incluindo alguns que são fontes de nitrogênio e carbono, mas nenhum aumentou a taxa de desuridililação de PII.

Com a finalidade de avaliar quais regiões da proteína GlnB estariam envolvidas no controle de diferentes funções, as formas mutantes da proteína GlnB G108A/P109A, G108W e Q3R/T5A foram construídas (BONATTO et al. 2005). Os resíduos Gly 108 e Pro 109 encontram-se na região C-terminal e fazem parte de um motivo em hélice 3_{10} localizado na superfície da proteína, enquanto os resíduos Gln 3 e Thr 5 estão na região N-terminal e voltados para a cavidade central da proteína. No mutante G108A/P109A os resíduos 108 e 109 foram substituídos por duas alaninas através de mutação sítio dirigida. Já os mutantes GlnB G108W e Q3R/T5A foram obtidos por PCR mutagênica aleatória. A capacidade destas proteínas de aliviar a inibição da proteína NifA de *K. pneumoniae* por NifL foi avaliada em estirpes de *E. coli*. Em presença destas proteínas, NifA foi capaz de ativar a transcrição do promotor do gene *nifH*. No entanto, a resposta da proteína NifA à concentração de amônio variou na presença das proteínas GlnB mutantes avaliadas (BONATTO et al. 2005). A proteína GlnB G108W restaurou a atividade da proteína NifA no mutante duplo *glnB⁻/glnK⁻* de forma similar a proteína GlnB nativa. No entanto, no mutante *glnD⁻*, e na presença da proteína GlnB G108W, a atividade da proteína NifA apresentou uma alta regulação por amônio, maior que a observada com as outras proteínas GlnB testadas. Estes resultados indicaram que a região C-terminal estaria envolvida na sinalização dos níveis de amônio pela proteína GlnB. Como a ativação

da proteína NifA de *K. pneumoniae* não depende do estado de uridililação de PII, o resultado observado na estirpe *glnD*⁻ pode resultar de uma mudança na interação com as moléculas efetoras (BONATTO et al. 2005). Neste trabalho, o perfil de uridililação observado para GlnB G108W foi diferente do observado para a proteína GlnB nativa e mais próximo ao da proteína GlnK de *H. seropedicae*. Este resultado reforça a importância da estrutura da região C-terminal na interação com a proteína GlnD e com os efetores.

Nos ensaios *in vivo*, na presença da proteína GlnB G108A/P109A, a atividade da proteína NifA de *K. pneumoniae* foi inferior à observada na presença da proteína GlnB nativa em todas as estirpes testadas. A atividade de NifA também apresentou maior regulação por amônio na presença desta proteína do que na presença da GlnB nativa na estirpe *glnB*⁻/*glnK*⁻ (BONATTO et al. 2005). Neste trabalho, a proteína G108A/P109A apresentou um perfil de uridililação similar ao da GlnB nativa, em contraste com a proteína GlnB G108W que foi similar à proteína GlnK. Apesar destas proteínas possuírem substituições na mesma região da proteína GlnB, a diferença no perfil de uridililação sugere que as substituições induziram mudanças topológicas distintas na mesma região das duas proteínas mutantes.

A proteína mutante GlnB Q3R/T5A apresenta duas substituições na região N-terminal da proteína. Na posição que corresponde ao resíduo 3, a glutamina, um aminoácido hidrofílico mas não carregado, foi substituído por uma arginina, que é carregada positivamente. Já no resíduo 5, a treonina que é um aminoácido hidrofílico, foi substituído por uma alanina, um aminoácido apolar. Esta proteína mutante apresentou um padrão de migração diferente das demais proteínas GlnB nos géis de eletroforese nativa. Apesar do motivo desta diferença de comportamento não ter sido identificado, esta proteína provavelmente encontra-se em sua forma trimérica, uma vez que ela foi uridililada *in vitro* pela proteína GlnD. A uridililação da proteína GlnB Q3R/T5A foi avaliada por eletroforese em condições desnaturantes para proteínas de baixo peso molecular e o perfil de uridililação observado foi similar ao da proteína GlnB nativa. Além disso, em ensaios *in vivo*, a atividade da proteína NifA de *K. pneumoniae* foi restaurada pela proteína GlnB Q3R/T5A de maneira similar à proteína GlnB nativa (BONATTO et al. 2005). Como na eletroforese nativa a migração é influenciada não só pela massa mas também pela carga das proteínas, é possível que as mutações nos resíduos 3 e 5 na proteína GlnB tenham provocado

alguma alteração na distribuição de cargas superficiais desta proteína que interferiram no seu perfil de migração.

As proteínas da família PII interagem com diversas moléculas e proteínas alvo para exercer seu papel biológico. JIANG e colaboradores (1997) mostraram que mutações em diferentes resíduos da proteína GlnB de *E. coli* afetam algumas destas interações mas não necessariamente todas. Neste trabalho, os resultados mostraram que mutações na mesma região da proteína GlnB de *H. seropedicae* interferiram de maneira diferente na atividade das proteínas GlnB mutantes.

A comparação dos resultados do perfil de uridililação/desuridililação das proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* obtidos neste trabalho com os resultados observados para as PII de *E. coli*, sugere que variações nestes perfis podem refletir o refinamento da capacidade das proteínas PII de diferentes organismos em responder às variações ambientais específicas dos seus habitats.

7. CONCLUSÕES

- As proteínas GlnB e GlnK são uridililadas e desuridililadas pela proteína GlnD de *H. seropedicae in vitro*; a uridililação da proteína GlnB é mais eficiente que a proteína GlnK, enquanto a taxa de desuridililação é similar para as duas proteínas;

- A uridililação das proteínas GlnB, GlnK e das proteínas GlnB mutantes requer ATP e 2-oxoglutarato e é inibida por glutamina;

- A uridililação da proteína GlnB é mais eficiente na presença de ATP, quando comparado a ADP e AMP, enquanto a uridililação da proteína GlnK, é similar na presença de ATP ou ADP, sugerindo que a proteína GlnK é menos sensível a mudanças nos níveis energéticos;

- Os perfis de uridililação das proteínas mutantes GlnB G108A/P109A e GlnB Q3R/T5A são similares ao perfil da proteína GlnB nativa; O perfil de uridililação da proteína GlnB G108W é similar ao da proteína GlnK, sugerindo que a substituição G108W causa uma mudança topológica da região C-terminal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6264-6272, 1975.

AJDIC, D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVÍC, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, p. 14434-14439, 2002.

ALDEHNI, M. F.; SAUER, J.; SPIELHAUPTER, C.; SCHMID, R.; FORCHHAMMER, K. Signal transduction protein P_{II} is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 2582-2591, 2003.

ALLEN, M. M. Inclusions: cyanophycin. **Methods Enzymol.**, v. 167, p. 207-213, 1988.

ALVAREZ-MORALES, A.; DIXON, R.; MERRICK, M. Positive and negative control of the *glnAntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO J.**, v. 3, p. 501-507, 1984.

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.**, vol. 155, p. 491-495, 2004.

ARAUJO, M. S.; BAURA, V. A.; SOUZA, E. M.; BENELLI, E. M.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. In vitro uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Prot. Expr. Purif.**, vol. 33, p. 19-24, 2004.

ARCONDÉGUY, T.; van HEESWIJK, W. C.; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 263-270, 1999.

ARCONDÉGUY, T.; LAWSON, D.; MERRICK, M. Two residues in the T-loop of GlnK determine NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 38452-38456, 2000.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 80-105, 2001.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J Bacteriol.**, v. 178, p. 4830-4838, 1996.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 339-343, 1999.

ATKINSON, M.R.; KAMBEROV, E.S.; WEISS, R. E.; NINFA, A. J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28288-28293, 1994.

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

ATKINSON, M.R.; NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 301-313, 1999.

ATKINSON, M. R.; BLAUWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Context-dependent functions of the PII and GlnK signal transduction proteins in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5364-5375, 2002.

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

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.

BALDANI J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BARRETT, J.; RAY, P.; SOBCHYK, A.; LITTLE, R.; DIXON, R. Concerted inhibition of the transcriptional activation functions of the enhancer-binding protein NifA by the anti-activator NifL. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 480-493, 2001.

BECKERS, G.; STRÖSSER, J.; HILDEBRANDT, U.; KALINOWSKI, J.; FARWICK, M.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. **Mol. Microbiol.**, v. 58, p. 580-595, 2005.

- BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidences for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4623-4626, 1997.
- BENELLI, Elaine Machado. Análise Estrutural e Funcional da Proteína PII, Controladora da Fixação de Nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1997. 200 f. Tese (doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.**, v. 47, p. 309-314, 2001.
- BENELLI, E.; MONTEIRO, R. A.; NOINDORF, L.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; BUCK, M. PII and GlnK proteins interact *in vitro* with the N-terminal domain of the NifA protein from *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXXI^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (2002: Caxambú). **Resumos...** Caxambú, 2002a. p. 236.
- BENELLI, E. M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 3296-3303, 2002b.
- BLANCO, G.; DRUMMOND, M.; WOODLEY, P.; KENNEDY, C. Sequence and molecular analysis of the *nifL* gene of *Azotobacter vinelandii*. **Mol. Microbiol.**, v. 9, p. 869-880, 1993.
- BLAUWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Nac-mediated repression of the *serA* promoter of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 45, 351-363, 2002a.
- BLAUWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. **Mol. Microbiol.**, v. 46, 203-214, 2002b.
- BLENCKE H. M.; HOMUTH, G.; LUDWIG, H.; MÄDER, U.; HECKER, M.; STÜLKE, J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. **Metab Eng**, vol. 5, p. 133-149, 2003.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BONATTO, Ana Claudia. Clonagem, Superexpressão e Purificação de uma Proteína Mutante de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2000. Monografia (bacharelado em Ciências Biológicas). Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; BENELLI, E. M. Effect of T- and C-loop mutations on the *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein in nitrogen signalling. **Res. Microbiol.**, vol. 156, p. 634-640, 2005.

BONATTO, A. C.; COUTO, G. H.; SOUZA, E. M.; ARAÚJO, L. M.; PEDROSA, F. O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E. M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Prot. Expr. Purif.**, vol. 55, p. 293-299, 2007.

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

BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the PII-regulatory protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 68, p. 2949-2953, 1971.

CARR, P. D.; CHEAH, E.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. X-ray structure of the signal transduction protein PII from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta Crystallogr. sect. D Biol. Crystallogr.**, v. 52, p. 93-104, 1996.

CHEAH, E.; CARR, P. D.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure**, vol. 2, p. 981-990, 1994.

CHEN, S. F.; DU, J. P.; WU, L. X.; ZHAO, Y. S.; LI, J. L.. Interaction between PII and NifA in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Chin Sci Bull**, vol. 48, p. 170-174, 2003.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, J. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr→Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol. Gen. Genomics**, vol. 273, p. 415-422, 2005.

CHOI, S. K.; SAIER, M. H. Jr. Regulation of *sigL* expression by the catabolite control protein CcpA involves a roadblock mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon e nitrogen metabolism. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 6856-6861, 2005.

COLE, S.T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E. 3RD; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, vol. 393, p. 537-544, 1998.

COLONNA-ROMANO, S.; PATRIARCA, E. J.; AMAR, M.; BERNARD, P.; MANCO, G.; LAMBERTI, A.; IACCARINO, M.; DEFEZ, R. Uridylylation of the PII protein in *Rhizobium leguminosarum*. **FEBS Lett.**, vol. 330, p. 95-98, 1993.

COMMICHAU, F. M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. **Cur Opin Microbiol.**, vol. 9, p. 167-172, 2006.

CONNELLY, H. M.; PELLETIER, D. A.; LU, T.; LANKFORD, P. K.; HETTICH, R. L. Characterization of PII family (GlnK1, GlnK2, and GlnB) protein uridylylation in response to nitrogen availability for *Rhodospseudomonas palustris*. **Anal. Biochem.**, vol. 357, p. 93-104, 2006.

CONROY, M. J.; DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X.; BULLOUGH, P. A.; WINKLER, F. K.; MERRICK, M. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 104, p. 1213-1218, 2007.

COUTO, Gustavo Henrique. Expressão e purificação da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2005. 99f. Dissertação (mestrado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, v. 21, p. 536-545, 2002.

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

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. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: endophytic N₂ fixing bacteria. **Cienc. Cult.**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DREPPER, T.; GROB, S.; YAKUNIN, A. F.; HALLENBECK, P. C.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, vol. 149, p. 2203-2212, 2003.

DRUMMOND, M. H.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. C. Sequence and domains relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to the other regulatory proteins. **EMBO J.**, v. 5, p. 441-447, 1986.

DRUMMOND, M. H.; WOOTTON, J. C. Sequence of *nifL* from *Klebsiella pneumoniae*: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 1, p. 37-44, 1987.

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. 281, p. 29558-29567, 2006.

EDWARDS, R.; MERRICK, M. The role of uridylyltransferase in the control of *Klebsiella pneumoniae nif* gene regulation. **Mol Gen Genet.**, v. 247, p. 189-198, 1995.

EGENER, T.; SARKAR, A.; MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Identification of a NifL-like protein in a diazotroph of the β -subgroup of the Proteobacteria, *Azoarcus* sp. Strain BH72. **Microbiology**, v. 148, p. 3203-3212, 2002.

EHLERS, C.; WEIDENBACH, K.; VEIT, K.; FORCHHAMMER, K.; SCHMITZ, R. A. Unique mechanistic features of post-translational regulation of glutamine synthetase in *Methanosarcina mazei* strain Gö1 in response to nitrogen availability. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 1841-1854, 2005.

ENGLEMAN, E. G.; FRANCIS, S. H. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 191, p. 602-612, 1978.

ESPINOSA, J.; FORCHHAMMER, K.; BURILLO, S.; CONTRERAS, A. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarato dependent manner with PII and NtcA. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 457-469, 2006.

FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.179, p. 303-310, 1999.

FINK, D.; WEIBSCHUH, N.; REUTHER, J.; WOHLLEBEN, W.; ENGELS, A. Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Mol. Microbiol.**, v. 46, p. 331-347, 2002.

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

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 84-91, 1994.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. Functional analysis of the phosphoprotein PII (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 2033-2040, 1995a.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. Phosphorylation of the PII protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of *in vitro* kinase activity. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5812-5817, 1995b.

FORCHHAMMER, K.; HEDLER, A. Phosphoprotein PII from cyanobacteria: analysis of functional conservation with the PII signal-transduction protein from *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, v. 244, p. 869-875, 1997.

FORCHHAMMER, K.; HEDLER, A.; STROBEL, H.; WEISS, V. Heterotrimerization of PII-like signalling proteins: implications for PII-mediated signal transduction systems. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 338-349, 1999.

FRANCIS, S. H.; ENGLEMAN, E. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. I. Studies on the uridylyl transferase and uridylyl removing enzyme(s) from *Escherichia coli*, **Arch. Biochem. Biophys.**, vol. 191, p. 590-601, 1978.

GARCIA-DOMINGUEZ, M.; FLORENCIO, F. J. Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Plant Mol. Biol.**, vol. 35, p. 723-734, 1997.

GONZALEZ, L.; PHALIP, V.; ZHANG, C. C. Modification of the PII protein in response to nitrogen availability in filamentous heterocystous cyanobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. *In: Nitrogen Fixation: from the molecules to crop productivity*. Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 107, 2000.

GRABBE, R.; KLOPPROGGE, K.; SCHMITZ, R. A. Fnr is required for NifL-dependent oxygen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 1385-1393, 2001.

GRUSWITZ, F.; O'CONNELL III, J.; STROUD, R. M. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 104, p. 42-47, 2007.

HANSON, T. E.; FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N.; MEEKS, J. C. Characterisation of the *glnB* gene product of *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133: *glnB* or the PII protein may be essential. **Microbiology**, vol. 144, p. 1537-1547, 1998.

HARRISON, M. A.; KEEN, J. N.; FINDLAY, J. B.; ALLEN, J. F. Modification of a *glnB*-like gene product by photosynthetic electron transport in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. **FEBS Lett.**, vol. 264, p. 25-28, 1990.

HE, L.; SOUPENE, E.; KUSTU, S. NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 7446-7455, 1997.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6661-6667, 1998.

HEINRICH, A.; MAHESWARAN, M.; RUPPERT, U.; FORCHHAMMER, K. The *Synechococcus elongatus* P signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p. 1303-1314, 2004.

HEINRICH, A.; WOYDA, K.; BRAUBURGER, K.; MEISS, G.; DETSCH, C.; STÜLKE, J.; FORCHHAMMER, K. Interaction of the membrane-bound GlnK-AmtB complex with the master regulator of nitrogen metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 34909-34917, 2006.

HESKETH, A.; FINK, D.; GUST, B.; REXER, H.-U. S.; SCHEEL, B.; CHATER, K.; WOHLLEBEN, W.; ENGELS, A. The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 2, p. 319-330, 2002.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HISBERGUES, M.; JEANJEAN, R.; JOSET, F.; TANDEAU DE MARSAC, N.; BEDU, S. Protein PII regulates both inorganic carbon and nitrate uptake and is modified by a redox signal in *Synechocystis* PCC 6803. **FEBS Lett.**, vol. 463, p. 216-220, 1999.

HOLM, L.; SANDER, C. DNA polymerase β belongs to an ancient nucleotidyltransferase superfamily. **Trends Biochem. Sci.**, vol. 20, p. 345-347, 1995.

HOLTEL, A. H.; MERRICK, M. Identification of the *Klebsiella pneumoniae glnB* gene: nucleotide sequence of wild-type and mutant alleles. **Mol. Gen. Genet.**, vol. 215, p. 134-138, 1988.

HSIEH, M.; LAM, H.; van de LOO, F.; CORUZZI, G. A PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 13965-13970, 1998.

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

HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Letters**, vol. 580, p. 5232-5236, 2006b.

IRMLER, A.; SANNER, S.; DIERKS, H.; FORCHHAMMER, K. Dephosphorylation of the phosphoprotein PII in *Synechococcus* PCC7942: identification of an ATP and 2-oxoglutarate-regulated phosphatase activity. **Mol. Microbiol.**, v. 26, p. 81-90, 1997.

IRMLER, A.; FORCHHAMMER, K. A PP2C-type phosphatase dephosphorylates the PII signaling protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 12978-12983, 2001.

JACK, R.; de ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1156-1162, 1999.

JAGGI, R.; van HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; OLLIS, D. L.; VASUDEVAN, S. G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **EMBO J.**, v. 16, p. 5562-5571, 1997.

JAKOBY, M.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 173, p. 303-310, 1999.

JAMES, E. K.; OLIVARES F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, p. 77-119, 1998.

JAVELLE, A.; EMMANUELE, S.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium Sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 8530-8538, 2004.

JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 170-172, 2005.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; TIRASOPHON, W.; CHANDRAN, R.; SCHEFKE, B. R.; NINFA, A. J. Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4342-4353, 1997.

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, 1998a.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 37, p. 12795-12801, 1998b.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylylation state. **Biochemistry**, v. 37, p. 12802-12810, 1998c.

- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. **Cell. Mol. Biol. Res.**, v. 40, p. 175-191, 1994a.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Effect of mutation 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, 1994b.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A. J. The *Escherichia* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 17797-17807, 1995.
- KESSLER, P. S.; DANIEL, C.; LEIGH, J. A. Ammonia switch-off of nitrogen fixation in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*: mechanistic features and requirement for the novel GlnB homologues, Nifl₁ and Nifl₂. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 882-889, 2001.
- KHADEMI, S.; O'CONNELL, J. 3RD; REMIS, J.; ROBLES-COLMENARES, Y.; MIERCKE, L. J.; 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.
- KIM, I. H.; KWAK, S. J.; KANG, J. S.; PARK, S. C. Transcriptional control of the *glnD* gene is not dependent on nitrogen availability in *Escherichia coli*. **Mol. Cells**, vol. 8, p. 483-490, 1998.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 887-891, 1997.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *H. seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 181, p. 165-170, 1999.
- KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R.; HOPPERT, M.; SCHMITZ, R. A. Membrane association of *Klebsiella pneumoniae* NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. **Arch. Microbiol.**, v. 177, p. 223-234, 2002.
- KLOSE, K. E.; WEISS, D. S.; KUSTU, S. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NtrC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. **J. Mol. Biol.**, v. 232, p. 67-78, 1993.
- KRAJEWSKA-GRYNKIEWICZ, K.; KUSTU, S. Evidence that nitrogen regulatory gene, *ntrC*, of *Salmonella typhimurium* is transcribed from the *glnA* promoter as well as from a separate *ntr* promoter. **Mol. Gen. Genet.**, v. 193, p. 135, 1984.
- KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 367-376, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LEE, H. M.; FLORES, E.; HERRERO, A.; HOUMARD, J.; TANDEAU de MARSAC, N. A role for the signal transduction protein P_{II} in the control of nitrate/nitrite uptake in a cyanobacterium. **FEBS Letters**, vol. 427, p. 291-295, 1998.

LEE, H. M.; FLORES, E.; FORCHHAMMER, K.; HERRERO, A.; TANDEAU de MARSAC, N. Phosphorylation of the signal transducer P_{II} protein and an additional effector are required for the P_{II}-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 591-600, 2000.

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

LEE, H. S.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. *In vitro* activity of NifL, a signal transduction protein for biological nitrogen fixation. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7683-7688, 1993b.

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

LIANG, Y. Y.; de ZAMAROCZY, M.; ARSENE, F.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 79, p. 113-119, 1992.

LIOTENBERG, S.; CAMPBELL, D.; CASTETS, A. M.; HOUMARD, J.; TANDEAU DE MARSAC, N. Modification of the PII protein in response to carbon and nitrogen availability in filamentous heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 144, p. 185-190, 1996.

LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; van HEESWIJK, W. C.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. **EMBO J.**, v. 19, p. 6041-6050, 2000.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifLNifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 15472-15481, 2002.

LITTLE, R.; DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 28711-28718, 2003.

- LIU, J.; MAGASANIK, B. Activation of the dephosphorylation of nitrogen regulator I-phosphate of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 926-931, 1995.
- LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation. **Curr. Top. Cell. Regul.**, v. 30, p. 23-56, 1989.
- MACHADO, I. M. P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1599-1602, 1996.
- MAHESWARAN, M.; URBANKER, C.; FROCHHAMMER, K. Complex formation and catalytic activation by the P_{II} signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 55202-55210, 2004.
- MARTIN, D. E.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Occurrence of three PII-like signal transmitter proteins in the diazotrophic proteobacterium *Azoarcus* sp. BH72. **Mol. Microbiol.**, v. 38, p. 276-288, 2000.
- MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Distinct roles of PII-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 2251-2259, 2002.
- MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p. 1731-1744, 2004a.
- MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; DIXON, R. A crucial arginine residue is required for a conformational switch in NifL to regulate nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 16316-16321, 2004b.
- MEAD, D. A.; SZCZENA-SKORUPA, E.; KEMPER, E. Single strand DNA "blue" T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Protein Eng.**, v. 1, p. 67-74, 1986.
- MELETZUS, D.; RUDNICK, P.; DOETSCH, N.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-amtB* operon of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, p. 3260-3264, 1998.
- MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, H.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 185, p. 75-81, 1982.
- 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**. London: Chapman & Hall, New York, p. 835-876, 1992.

- MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.**, vol. 59, p 604-622, 1995.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 447, p. 283-286, 1999a.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. In-trans regulation of the N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 157-161, 1999b.
- MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Fnr is involved in oxygen control of *Herbaspirillum seropedicae* N-truncated NifA protein activity in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol.**, vol. 69, p. 1527-1531, 2003.
- MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067-6074, 1993.
- NINFA, A. J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 83, p. 5909-5913, 1986.
- NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 172-179, 2000.
- NOINDORF, L.; REGO, F. G. M.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, v. 185, p. 55-62, 2006.
- NOINDORF, L. Identificação e caracterização do operon *orf1glnKamtB* e do gene *amth* de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2006. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.
- PAHEL, G.; ROTHSTEIN, D. M.; MAGASANIK, B. Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.150, p. 202-213, 1982.
- PALINSKA, K. A.; LALOUI, W.; BÉDU, S.; GOËR, S. L.; CASTETS, A. M.; RIPPKA, R.; TANDEAU DE MARSAC, N. The signal transducer PII and bicarbonate acquisition in *Prochlorococcus marinus* PCC9511, a marine cyanobacterium naturally deficient in nitrate and nitrite assimilation. **Microbiol.**, v. 148, p. 2405-2412, 2002.

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

PEDROSA, F. O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. M. P.; STEFFENS, M. B. R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; ISHIDA, M. L.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 843-846, 1997.

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.**, v. 91, p. 189-195, 2001.

PEREZ-RUEDA, E.; COLLADO-VIDES, J. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Res.**, vol. 28, p. 1838-1847, 2000.

PERLOVA, O.; URETA, A.; NORDLUND, S.; MELETZUS, D. Identification of three genes encoding P(II)-like proteins in *Gluconacetobacter diazotrophicus*: studies of their role(s) in the control of nitrogen fixation. **J. Bacteriol.**, vol. 185, p. 5854-5861, 2003.

PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 192, p. 217-221, 2000.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991.

PORTUGAL, Magda Eline Guerrart. Caracterização da proteína GlnK de *Streptococcus mutans*. Curitiba, 2006. 110 f. Dissertação (mestrado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.

POSTGATE, J. R. **Nitrogen fixation**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

POSTMA, P. W.; LENGELER, J. W.; JACOBSON, J. R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. **Microbiol Rev.**, vol. 57, p. 543-594, 1993.

QUAN, J. A.; SCHNEIDER, B. L.; PAULSEN, I. T.; YAMADA, M.; KREDICH, N. M.; SAIER, M. H. Jr. Regulation of carbon utilization by sulfur availability in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiology**, v. 148, p. 123-131, 2002.

RABUS, R.; REIZER, J.; PAULSEN, I.; SAIER, M. H. Jr. Enzyme I^{Ntr} from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. **J. Biol. Chem.**, vol. 274, p. 26485-26191, 1999.

REIZER, J.; REIZER, A.; SAIER, M. H. Jr, JACOBSON, G. R. A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria. **Protein Sci.**, vol 1, p. 722-726, 1992.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **J. Bacteriol.**, v.183, p. 3076-3082, 2001.

RHEE, S. G.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 213-241, 1985.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, v.35, p.261-270, 2003a.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 45, p. 39-47, 2003b.

RUDNICK, P.; COLNAGUI, R.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Molecular analysis of the *glnB*, *amtB*, *glnD* and *glnA* genes in *Azotobacter vinelandii*, p. 123-124. In C. Elmerich, A. Kondorosi, and W. E. Newton (Ed.), Biological nitrogen fixation for the 21st century. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1998.

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

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; BURLINGAME, A. L.; KOSHLAND, D. E. Jr. Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalent intermediate activates transcription. **J. Bacteriol.**, v.174, p. 5117-5122, 1992.

SCHAGGER, H.; von JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SCHMITZ, R. A. NifL of *Klebsiella pneumoniae* carries an N-terminally bound FAD cofactor, which is not directly required for the inhibitory function of NifL. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 157, p. 313-318, 1997.

SENIOR, P. J. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. **J. Bacteriol.**, v. 123, p. 407-418, 1975.

SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 8690-8695, 1987.

SOUZA EM, FUNAYAMA S, RIGO LU, PEDROSA FO. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, v. 37, p. 425-429, 1991a.

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

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, vol. 181, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

STADTMAN, E. R.; GINSBURG, A.; CIARDI, J. E.; YEH, J.; HENNING, S. B.; SHAPIRO, B.M. Multiple molecular form of glutamine synthetase produced by enzyme catalysed adenylation and deadenylation reaction. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 8, p. 99-118, 1970.

STIPS, J.; THUMMER, R.; NEUMANN, M.; SCHMITZ, R. A. GlnK effects complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 3379-3388, 2004.

STRÖSSER, J.; LÜDKE, A.; SCHAFFER, S.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 132-147, 2004.

THIEFFRY, D.; SALGADO, H.; HUERTA, A. M.; COLLADO-VIDES, J. Prediction of transcriptional regulatory sites in the complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Bioinformatics**, v. 14, p. 391-400, 1998.

THOMAS, G.; COUTTS, G.; MERRICK, M. The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends. Genet.**, v. 16, p. 11-14, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity for progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TSINORENAS, N. F.; CASTETS, A. M.; HARRISON, M. A.; ALLEN, J. F.; TANDEAU DE MARSAC, N. Photosynthetic electron transport controls nitrogen assimilation in cyanobacteria by means of posttranslational modification of the *glnB* gene product. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, p. 4565-4569, 1991.

van HEESWIJK, W.C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 133-146, 1996.

van HEESWIJK, W.C.; WEN, D.; CLANCY, P.; JAGGI, R.; OLLIS, D. L.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers *in vivo*: fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 3942-3947, 2000.

von WIREN, N.; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. **Topics Curr. Genet.**, v. 9, p. 95-120, 2004.

WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 756-764, 2000.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, I.; DÖBEREINER J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants. **Plant Soil**, v. 210, p. 103-113, 1999.

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

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

WRAY, L. V.; Jr, ATKINSON, M. R.; FISHER, S. H. The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis nrgAB* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli glnB*-encoded P_{II} protein. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 108-114, 1994.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; van HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H.V.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J. Mol. Biol.**, v. 282, p. 149-65, 1998.

XU, Y.; CARR, P. D.; HUBER, T.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. The structure of the PII-ATP complex. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 2028-2037, 2001.

- ZHANG, C. C.; LIBS, L. Cloning and characterisation of the *pknD* gene encoding an eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. **Mol. Gen. Genet.**, vol. 258, p. 26-33, 1998.
- ZHANG, Y., BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.**, vol. 152, p. 195-204, 1997.
- ZHANG, Y., POHLMANN, E. L.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA* and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, vol. 182, p. 983-992, 2000.
- ZHANG, Y., POHLMANN, E. L.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. **J. Bacteriol.**, vol. 183, p. 6159-6168, 2001.
- ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, vol. 101, p. 2782-2787, 2004.
- ZHANG, Z.; GOSSET, G.; BARABOTE, R.; GONZALEZ, C. S.; CUEVAS, W. A.; SAIER, M. H. Jr. Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, vol. 187, p. 980-990, 2005.
- ZHU, Y.; CONRAD, M. C.; ZHANG, Y.; 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.**, vol. 188, p. 1866-1874, 2006.