

THIAGO ESTEFANO RODRIGUES

Identificação e estudo *in vitro* da interação de proteínas PII com a proteína
carreadora de carboxil-biotina (BCCP) em *Escherichia coli*

CURITIBA

2013

THIAGO ESTEFANO RODRIGUES

Identificação e estudo *in vitro* da interação de proteínas PII com a proteína
carreadora de carboxil-biotina (BCCP) em *Escherichia coli*

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Dr. Luciano Fernandes Huergo

Co-orientador: Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

THIAGO ESTEFANO RODRIGUES

Identificação e estudo da interação de proteínas PII com a proteína carreadora de carboxil-biotina (BCCP) em *Escherichia coli*

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica, no programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná pela Seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr. Marco Aurélio Schüler de Oliveira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

Departamento de Patologia Básica – UFPR

Curitiba, 29 de novembro de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre comigo, iluminando meu caminho.

Ao professor Dr. Luciano Fernandes Huergo por ser exemplo de orientador, de ser humano, de humildade e sabedoria.

Aos demais professores do departamento de bioquímica, especialmente ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela co-orientação, pelas importantes sugestões e aconselhamentos.

Aos meus grandes amigos Bruno Gomes Carvalho e Marcos Tarcísio de Carvalho, pela amizade eterna.

Aos amigos do laboratório, Edileusa, Vanessinha, Marcelo Scarduelli, Luíza, Helo, Bel, Rocio, Leilane e Rafaela, pela amizade.

Aos técnicos Alex, Dona Rose e Valter e a todos do grupo de Fixação biológica de Nitrogênio, pelas colaborações.

Ao Dr. Marco Aurélio S. De Oliveira pelas reações de uridililações. À Dr. Luíza M. de Araújo pelas proteínas de *A. brasilense* cedidas. Ao Dr. Mike Merrick, Dr. Aileen Soriano e Dra. Anne Chapman-Smith pelos plasmídeos cedidos.

Ao programa de pós-graduação em Ciências-Bioquímica do dpto de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

Às agências financiadoras CAPES, Fundação Araucária, INCT e ao CNPq pela bolsa.

À minha mãe, pelo exemplo de luta e superação.

A simplicidade
é o último degrau da sabedoria
Khalil Gibran

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	8
Lista de figuras.....	9
Lista de tabelas.....	10
Resumo.....	11
Abstrat.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Proteínas da família PII.....	13
1.2 Acetil-CoA carboxilase.....	17
1.2.1 Subunidades da ACC.....	20
1.2.1.1 Biotina carboxilase – BC.....	20
1.2.1.2 Carboxiltransferase – CT.....	23
1.2.1.3 Proteína carreadora de carboxil-biotina – BCCP.....	25
1.3 Síntese de ácidos e graxos e regulação da ACC.....	30
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivos gerais.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 JUSTIFICATIVA.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Meios e condições de cultivo celular.....	37
4.2 Plasmídeos e células.....	37
4.3 Purificação de plasmídeos.....	38
4.4 Transformação bacteriana por choque térmico.....	38
4.5 Amplificação, restrição e ligação de DNA.....	38
4.6 Eletroforese de DNA.....	39
4.7 Purificação de proteínas.....	39
4.8 Dosagem de proteínas.....	40
4.9 Eletroforese de proteínas.....	41
4.10 Reação de biotilação.....	41
4.11 Western blot.....	41
4.12 Pull Down.....	42
4.13 Atividade da ACC.....	42
5 RESULTADOS.....	44

5.1 Purificação das subunidades da ACC e das proteínas PII	44
5.2 Biotinilação da BCCP	48
5.3 Interação GlnK-BCCP	50
5.4 Atividade da ACC na presença de GlnK	57
5.5 Complexo ternário BC-BCCP-PII	59
5.6 Atividade da ACC na presença de GlnB	61
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	=	5' difosfato de adenosina
ATP	=	5' trifosfato de adenosina
BSA	=	<i>bovine serum albumin</i> - albumina sérica bovina
CoA	=	Coenzima A
Da	=	Daltons
D.O	=	densidade óptica
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	ácido etilenodiamino-tetra ético
FT	=	<i>flow through</i>
HEPES	=	N-[2-hidroxietil]piperazina-N' - [2-etanosulfonato]]
HRP	=	<i>horseradish peroxidase</i>
IPTG	=	β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
LA	=	meio Luria Agar
LB	=	meio Luria-Bertani
LC/MS	=	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LDAO	=	n-dodecil-N-N-dimetilamina-N-oxide
MM	=	massa molecular
PMSF	=	fenilmetanosulfonil luoreto
rpm	=	rotação por minuto
RMN	=	ressonância magnética nuclear
SDS	=	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	=	SDS- <i>polyacrylamide gel electroforesis</i>
TBST	=	solução salina com Tris acrescida de Tween 20
Tris	=	tris(hidroximetil)-aminometano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral de PII – GlnK de <i>E. coli</i>	13
Figura 2 - Estrutura geral de PII – GlnB de <i>E. coli</i>	14
Figura 3 - Esquema da reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase de <i>E. coli</i>	17
Figura 4 - Mecanismo da reação catalisada pela ACC de <i>E. coli</i>	20
Figura 5 - Estrutura geral da BC de <i>E. coli</i>	21
Figura 6 - Estrutura geral da CT α e β de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figura 7 - Esquema da autoregulação da transcrição da CT de <i>E. coli</i>	23
Figura 8 - Esquema da translocação da biotina por BCCP.....	25
Figura 9 - Esquema da reação de biotinilação da BCCP catalisada pela BirA de <i>E. coli</i>	26
Figura 10 - Estrutura geral da BCCP C-terminal de <i>E. coli</i>	27
Figura 11 – Estrutura geral do complexo BC-BCCP de <i>E. coli</i>	28
Figura 12 – Metabolismo de ácidos graxos em <i>E. coli</i>	30
Figura 13 - Purificação das subunidades da ACC de <i>E. coli</i>	44
Figura 14 - Purificação da His-GlnK de <i>E. coli</i>	45
Figura 15 - Purificação de BCCP, GlnK e GlnB de <i>E. coli</i>	46
Figura 16 - Biotinilação da BCCP de <i>E. coli</i>	48
Figura 17 - Interação entre GlnK e holoBCCP de <i>E. coli</i>	50
Figura 18 - Interação entre GlnK e BCCP de <i>E. coli</i> requer biotinilação de BCCP.....	51
Figura 19 - Efeito da concentração de ATP e 2-OG sob o complexo GlnK-holoBCCP de <i>E. coli</i>	52
Figura 20 - Efeito da razão ATP/ADP e 2-OG sob o complexo GlnK-holoBCCP de <i>E. coli</i>	53
Figura 21 - Efeito de metais divalentes e da uridililação de GlnK na interação GlnK-holoBCCP de <i>E. coli</i>	54
Figura 22 - Atividade <i>in vitro</i> da acetil-CoA carboxilase de <i>E. coli</i>	56
Figura 23 - Efeito de GlnK na atividade <i>in vitro</i> da acetil-CoA carboxilase de <i>E. coli</i>	57
Figura 24 – interação GlnK-holoBCCP.....	58
Figura 25 - Formação do complexo ternário BC-holoBCCP-PII.....	59
Figura 26 - Efeito de GlnB na atividade <i>in vitro</i> da acetil-CoA carboxilase de <i>E. coli</i>	60
Figura 27 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas BCCP de <i>E. coli</i> , <i>A. brasilense</i> e <i>A. thaliana</i>	65
Figura 28 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas PII de <i>E. coli</i> e <i>A. brasilense</i>	66
Figura 29 – Regulação do metabolismo por 2-OG.....	68
Figura 30 - Regulação da ACC por PII.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Células e plasmídeos.....	36
--------------------------------------	----

RESUMO

A família de proteínas PII é uma das mais amplamente distribuída família de proteínas transdutoras de sinais na natureza. As PII têm sido descritas como sendo proteínas chave na regulação do metabolismo de nitrogênio. As proteínas PII são capazes de sensoriar sinais de nitrogênio, carbono e energia. As proteínas PII controlam a atividade de diversas proteínas alvo através de interação proteína-proteína. Tais interações são moduladas pelos níveis celulares de glutamina, 2-oxoglutarato e a razão ATP/ADP. Estes metabólitos regulam a capacidade das proteínas PII de alterar sua conformação tridimensional e isto, por sua vez, afeta a habilidade de PII de interagir com suas diferentes proteínas alvo. Devido à capacidade única das proteínas PII de sensoriar importantes metabólitos celulares acredita-se que o número de vias metabólicas reguladas por PII seja bem maior do que as interações já descritas na literatura. Recentemente, em *Arabidopsis thaliana*, PII foi reconhecida como sendo capaz para interagir com a proteína carreadora de carboxil-biotina (BCCP), uma das subunidade da acetil-CoA carboxilase (ACC), a enzima que catalisa a primeira e irreversível etapa da síntese ácidos graxos. A ACC teve sua atividade inibida em até 50% na presença da proteína PII em *A. thaliana*. Neste trabalho, foi hipotetizado que a interação PII-BCCP seria um evento conservado também em bactérias. Ensaio *in vitro* utilizando as proteínas purificadas de *Escherichia coli* confirmaram essa hipótese. Além disso, foi verificado que a interação entre as proteínas PII e BCCP de *E. coli* é afetada positivamente por MgATP e negativamente por 2-oxoglutarato, de maneira dose dependente. A interação foi modestamente afetada pela uridililação de PII, no entanto, o estado de biotinilação de BCCP foi fundamental para a interação, ocorrendo somente com a BCCP biotinilada. No presente estudo, foi demonstrado que somente a proteína PII GlnB, mas não a proteína PII GlnK, de *E. coli* é capaz de formar complexo ternário com as subunidades BCCP e BC da enzima acetil-CoA carboxilase. Além disso, resultados preliminares indicam que GlnB, mas não GlnK, é capaz de inibir parcialmente a atividade da ACC de *E. coli in vitro*.

ABSTRAT

The PII family comprises one of the most widely distributed family of signal transduction proteins in nature. The PII proteins have been described as keys regulator of the nitrogen metabolism in bacteria. The PII proteins are able to act as nitrogen, carbon and energy sensors. PII proteins control the activities of a diverse range of targets proteins through direct protein-protein interaction. These protein interactions are, in turn, modulated by the cellular levels of glutamine, 2-OG and the ATP/ADP ratio. These metabolites act to regulate the ability of PII proteins to switch between different conformations, thereby affecting the ability of PII to interact with its target proteins. Given the ability of PII to sense key metabolic signals it was suggested that the number of metabolic pathways regulated by PII is larger than currently described. It was reported recently, in *Arabidopsis thaliana*, that PII interacts with the biotin carboxyl carrier protein (BCCP), a component of the acetyl-CoA carboxylase (ACC), the enzyme which catalyzes the first and committed step in fatty acid biosynthesis. In *A. thaliana*, the ACC activity was inhibited in 50% in the presence of PII. In this work it was hypothesized that the PII-BCCP interaction would be conserved throughout Bacteria. *In vitro* experiments using the purified proteins confirmed that the PII-BCCP interaction is conserved in *Escherichia coli*. The *E. coli* BCCP-PII interaction responded positively to MgATP and negatively to 2-oxoglutarate, in a dose dependent manner. The interaction was modestly affected by the posttranslational uridylylation status of PII; however, it was completely dependent on the posttranslational biotinylation of BCCP. We also showed that GlnB but not GlnK can form a ternary complex together with the BCCP and biotin carboxylase (BC), components of ACC. Moreover, preliminary results suggested that GlnB but not GlnK can inhibit the ACC activity *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas da família PII

As proteínas da família PII são proteínas transdutoras de sinais que integram o metabolismo de nitrogênio e carbono com o status de energia. As proteínas da família PII são uma das proteínas transdutoras de sinais mais amplamente distribuídas na natureza, encontradas em Bactéria, em Archaeas fixadoras de nitrogênio e no cloroplasto de eucariotos fototróficos (algas vermelhas e plantas) (FORCHHAMMER, 2008).

As proteínas PII regulam a atividade de outras proteínas em virtude de sua capacidade de interação proteína-proteína, regulando assim, diversos alvos tais como proteínas de membrana, enzimas e fatores de transcrição (LEIGH e DODSWORTH, 2007; FORCHHAMMER, 2008).

As proteínas PII podem ser divididas em três subfamílias de proteínas, codificadas pelos genes *glnK*, *glnB* e *nifl*. As proteínas GlnK e GlnB de *E. coli* estão proximamente relacionadas e possuem muitas funções sobrepostas. Por sua vez a proteína Nifl está mais relacionada a função de regulação pós-traducional da nitrogenase e é restrita a Archaea fixadora de nitrogênio e a algumas bactérias anaeróbicas (FORCHHAMMER, 2008; HUERGO, CHANDRA e MERRICK, 2012).

A fixação biológica do nitrogênio é catalisada pela enzima nitrogenase, a forma mais comum desta enzima é constituída pelas proteínas NifH (dinitrogenase redutase) e NifDK (dinitrogenase). Os genes *nifl* são *nifl1* e *nifl2* e estão localizados entre os genes *nifH* e *nifD* (KESSLER e LEIGH, 1999). Os genes *nifl* codificam as proteínas Nif1 e Nif2 que formam um hetero-oligômero, possivelmente um dodecâmero, na presença de 2-OG. Essas proteínas são capazes de se ligar a subunidade NifDK da enzima nitrogenase, inativando-a *in vitro*. Na ausência de 2-OG e presença de MgATP as Nif1 e Nif2 ligam-se a NifDK e inibem a ligação da subunidade NifH, tornando a nitrogenase inativa (DODSWORTH, 2005).

As proteínas PII de *E. coli*, GlnB e GlnK, são as proteínas mais bem estudadas entre as proteínas PII. As proteínas PII de *E. coli* apresentam 112 resíduos de aminoácidos e são homotriméricas, formando uma estrutura em forma de barril. Cada monômero apresenta 2 cadeias alfa-hélices e seis folhas-beta. Essa estrutura está arranjada de tal forma que 2 cadeias alfa-hélices e 4 cadeias folhas-

beta formam um duplo motivo beta-alfa-beta conectados por uma longa volta, chamada de volta-T, com 19 resíduos de aminoácidos. Uma segunda volta chamada volta-B, menor que a volta-T, ocorre entre a segunda alfa-hélice e a quarta folha beta. Há ainda uma terceira volta, a volta-C, localizada entre a quinta e sexta folha beta, na porção C-terminal (FIGURA 1) (CHEAH *et al.*, 1994). Essas regiões são bastante conservadas dentro da família PII e no trímero de PII as voltas B, C e T constituem a fenda de ligação entre as subunidades para os efetores ATP, ADP e 2-OG (HUERGO, CHANDRAN e MERRICK, 2012).

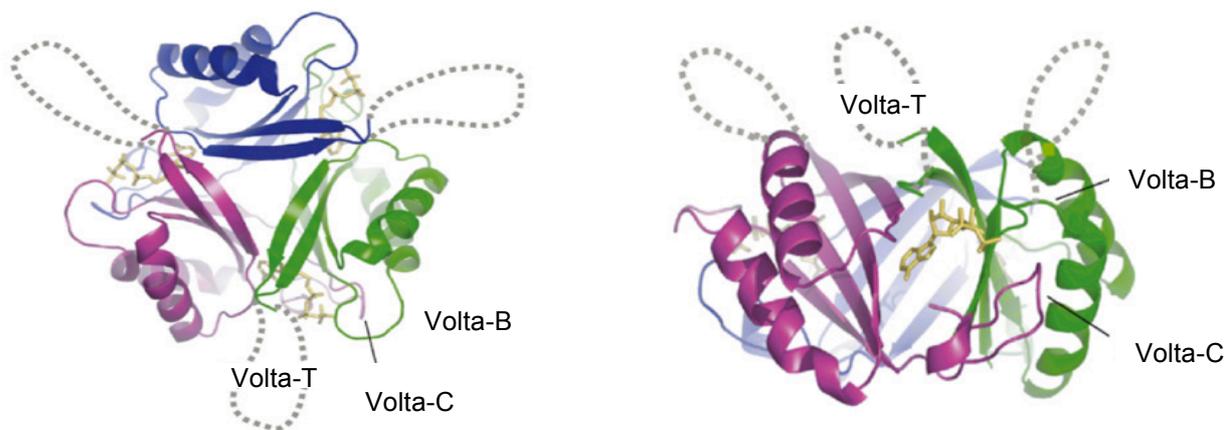


FIGURA 1 - Estrutura geral de PII – GlnK de *E. coli*

Cada monômero está representado em diferentes cores. A volta-T está representada em linha tracejada. A esquerda a vista superior da proteína e a direita a vista lateral. Em estrutura de bastão em amarelo se tem representado o ADP, na fenda entre subunidades.

FONTE: Forchhammer (2008)

A volta-T parece favorecer fortemente a interação das proteínas PII com proteínas alvo, isso pode ocorrer devido a sua alta flexibilidade (FORCHHAMMER, 2008). Foi demonstrado que a interação de GlnB de *E. coli* com alguns de seus alvos tais como adenililtransferase (GlnE), uridililtransferase (GlnD) e a proteína Histidina quinase NtrB são altamente dependentes da volta-T (JAGGI *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 1997a; JIANG *et al.*, 1997b).

A volta-T pode adotar múltiplas conformações em resposta a presença de determinadas concentrações dos efetores ATP, ADP e 2-OG (2-oxoglutarato), os quais regulam as proteínas PII alostericamente. Em *Synechococcus elongatus* foram verificadas até 3 moléculas de ATP, 2-OG e Mg^{2+} ligadas simultaneamente em cada trímero na estrutura de cristal. Em *S. elongatus* e *E. coli* ATP e 2-OG apresentam

cooperatividade negativa de ligação, de tal modo que o K_d da segunda e terceira molécula aumenta consideravelmente em relação ao K_d da primeira molécula (FOKINA *et al*, 2010b; KANBEROV *et al*, 1995; JIANG, PELISKA e NINFA, 1998a).

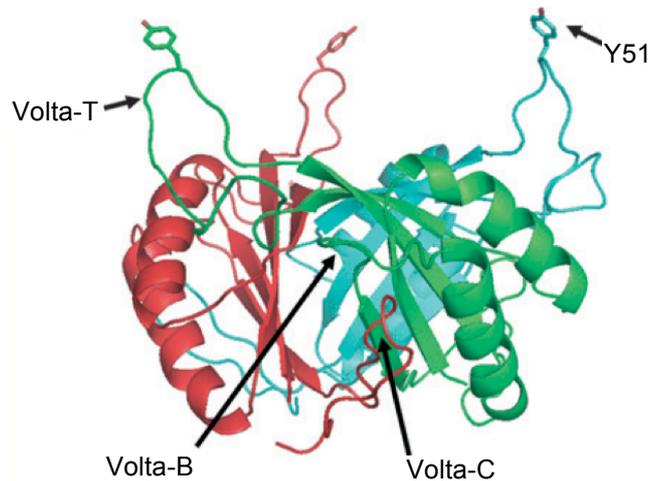


FIGURA 2 – Estrutura geral de PII – GlnB de *E. coli*.

Cada monômero está representado em diferentes cores. Na volta-T está representado o resíduo do aminoácido tirosina 51

FONTE: Huergo, Chandran e Merrick (2012).

Em Proteobactéria, as proteínas PII podem ser modificadas por ligação covalente de um grupo uridilil. A volta-T possui um resíduo bastante conservado de tirosil 51 (Tyr51) ao qual pode ser adicionado covalentemente um grupamento uridilil (UMP) em cada monômero (FIGURA 2). A desuridililação das proteínas PII é catalisada pela atividade removedora de uridilil (UR) da enzima GlnD, quando sob choque de amônio. A uridililação é promovida pela atividade uridililtransferase (UTase) da proteína GlnD, que ocorre em resposta a baixa concentração de nitrogênio extracelular. Os níveis de nitrogênio são sinalizados por glutamina intracelular. Sob choque de amônio, o nível de glutamina intracelular é alta e as PII são desuridililadas por GlnD, quando sob baixo nitrogênio, glutamina é baixa e as PII são uridililadas (JIANG, PELISKA, e NINFA, 1998a).

As proteínas PII possuem função sensorial. Esse conceito é sustentado pela sinalização de 2-OG, glutamina e da taxa ATP/ADP aos correspondentes status de carbono, nitrogênio e energia intracelular, respectivamente. As proteínas PII são modificadas conformacionalmente de acordo com os níveis de 2-OG, glutamina e

ATP/ADP, tendo assim, suas funções reguladas (HUERGO, CHANDRA e MERRICK, 2012).

Conforme as mudanças na disponibilidade de nitrogênio, a atividade de certas enzimas-chave e de fatores de transcrição são controlados em bactéria por um sistema de controle do metabolismo geral de nitrogênio, o sistema Ntr (sistema de regulação de nitrogênio), no qual as proteínas da família PII são atuantes através de interação com proteínas-chave. Em geral, em outros gêneros de bactéria o sistema Ntr funciona de forma semelhante ao de *E. coli* (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Em *E. coli*, a concentração de 2-OG sob alta disponibilidade de nitrogênio foi mostrada em até 1,5 mM e sob baixa disponibilidade de nitrogênio em até 0,1 mM. Estes dados sugerem que a concentração de 2-OG pode ser indicador do status de nitrogênio celular. Deste modo, PII é capaz de perceber o status de nitrogênio por meio de duas moléculas, glutamina e 2-OG (RADCHENKO *et al*, 2010). A real gama fisiológica da concentração de 2-OG intracelular é difícil de se mensurar, havendo bastante discrepância na literatura, no entanto, acredita-se que o mínimo de 2-OG intracelular ocorra em torno de 30 μ M (JIANG e NINFA, 2009).

O 2-OG é uma molécula intermediária do ciclo do ácido cítrico que tem sido descrita como sendo sinalizadora intracelular dos níveis de carbono. O nível de 2-OG é significativamente reduzido quando *E. coli* é submetida à privação de carbono (YAN, LENZ e HWA., 2011). Além disso, um estudo recente mostra que 2-OG atua como o mais importante metabólito regulador da síntese de proteínas, por inibir a produção de cAMP (YOU *et al.*, 2013). Recentemente, uma nova função de PII relacionada à percepção de carbono foi reconhecida. Em *Arabidopsis thaliana*, a proteína PII plastidial foi capaz de regular a atividade da acetil-CoA-carboxilase (ACC). Neste caso, PII de planta foi capaz de inibir ACC na presença de MgATP, mas não na presença de MgATP e 2-OG. (FERIA BOURRELLIER *et al*, 2010). Os resultados que serão apresentados neste trabalho sugerem que a interação entre PII e ACC é conservada em procariotos, o que suporta que as proteínas PII desempenham um importante papel no controle do metabolismo de carbono em bactérias. Mais detalhes sobre a enzima acetil-CoA carboxilase serão explorados a seguir.

Escherichia coli é pertencente à classe γ das Proteobactérias e tem sido amplamente usada como modelo experimental para o estudo de muitos sistemas

biológicos. Os fundamentos do conhecimento que se tem sobre o controle do metabolismo de nitrogênio em Bactéria foi quase que por completo proveniente de pesquisas com bactérias entéricas, principalmente com *E. coli*. Além disso, há muitas evidências de que os princípios fundamentais aprendidos em *E. coli* se aplicam aos processos de controle de do metabolismo de nitrogênio de outros gêneros de Bactéria (MERRICK & EDWARDS, 1995). Neste trabalho, foi adotado *E. coli* como organismo modelo de estudo de proteínas PII.

1.2 Acetil-CoA carboxilase

A acetil-CoA carboxilase (ACC [EC 6.4.1.2]) pertence a onipresente família de enzimas que requerem biotina como co-enzima para catalisar a carboxilação, descarboxilação e transcarboxilação de metabólitos. A ACC catalisa a carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA em plantas, animais e bactérias (WAKIL *et al.*, 1983; POLYAK *et al.*, 2012). Existem dois tipos fisicamente distintos desta enzima na natureza. Bactérias e a maioria dos cloroplastos das plantas possuem a acetil-CoA carboxilase multi-subunidades (MS-ACC), composta por CT (carboxiltransferase) em suas subunidades alfa e beta, BC (biotina carboxilase) e BCCP (proteína carreadora de carboxil-biotina). Em mamíferos, fungos e no citosol de plantas ocorre a forma polipeptídica única e multifuncional da acetil-CoA carboxilase (CRONAN JR e WALDROP, 2002). Há também algumas formas intermediárias da ACC, como na bactéria gram positiva *Streptomyces coelicolor* em que se encontram os complexos BC-BCCP e CT α - β unidos (DIACOVICH *et al.*, 2002).

Em humanos, ocorrem duas isoformas de ACC, a ACC1 e a ACC2. A ACC1, que ocorre no fígado, tecido adiposo e glândulas mamárias, está envolvida na síntese de ácidos graxos. Já a outra isoforma, a ACC2, que é encontrada no fígado, no coração e na musculatura esquelética, está envolvida na inibição da oxidação dos ácidos graxos (POLYAK *et al.*, 2012).

A ACC é atuante na primeira e limitante etapa da síntese de ácidos graxos. A reação catalisada pela ACC ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, catalisada pela subunidade BC, ocorre a transferência de um grupo carboxil do bicarbonato para a biotina ligada a BCCP de maneira dependente de hidrólise de ATP. Na segunda etapa, o grupo carboxil ligado a biotina é transferido pela CT para o acetil-CoA formando o malonil-CoA e regenerando a BCCP biotilada (FIGURA 3)

(ALBERTS *et al.*, 1969, ALBERTS *et al.*, 1971; GUCHHAIT *et al.*, 1971).

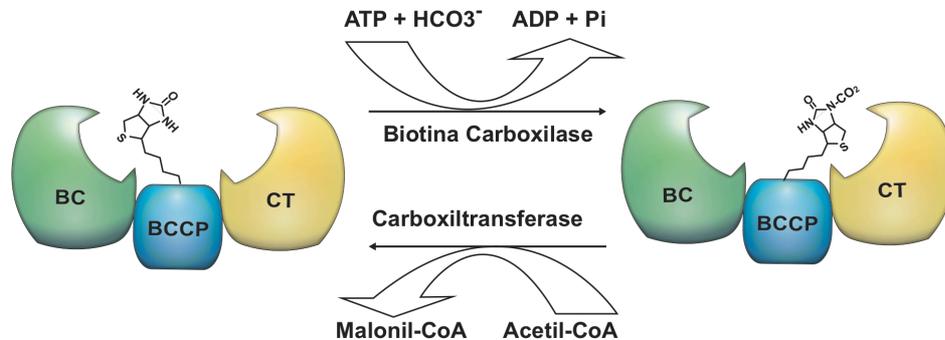


FIGURA 3 –Esquema da reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase

FONTE: O autor (baseado em Cronan Jr e Waldrop, 2002)

Os genes para BCCP (*accB*) e BC (*accC*) são co-transcritos em *E. coli* (JAMES e CRONAN Jr, 2004; LI e CRONAN JR, 1992a). Por sua vez, os genes que codificam as subunidades α (*accA*) e β (*accD*) de CT estão localizados em lados opostos do cromossomo de *E. coli* (LI e CRONAN JR, 1992a). A localização dos genes de MS-ACC de plantas varia conforme a espécie. Em plantas mais primitivas os genes *accC* e *accD* estão juntos com *accB* no genoma do cloroplasto. Já em plantas modernas apenas *accC* pertence ao genoma do cloroplasto. Com isso, acredita-se que a ACC multi-funcional das plantas tem origem da MS-ACC de bactéria (FIGURA 4) (HUANG *et al.*, 2002; CRONAN JR e WALDROP, 2002). Além disso, as enzimas ACC dos diferentes organismos, independente do número de subunidades, possuem significativa conservação de aminoácidos.

Em bactérias, a síntese de ácidos graxos tem como principal finalidade a manutenção e constituição de membrana celular, sendo a etapa limitante da síntese de fosfolípidos em Bactéria. Os fosfolípidos possuem um único papel em Bactéria, o de constituição da membrana celular (LI e CRONAN JR, 1993). Em organismos unicelulares a membrana celular é uma estrutura crítica na defesa e comunicação com fatores externos. Sendo assim, a ACC torna-se um alvo potencial e importante de drogas no desenvolvimento de antibióticos contra certas bactérias patogênicas (POLYAK *et al.*, 2012).

Em humanos e outros animais a formação em excesso de ácidos graxos de cadeias longas e de triacilglicerídeos podem estar associada à disfunções

hormonais e a síndromes metabólicas, levando à obesidade e a problemas cardiovasculares. Sendo assim, a possibilidade de um agente terapêutico seria de grande valia no tratamento. Por isso, a ACC humana, poderia ser alvo de novos agentes terapêuticos contra a obesidade epidêmica (TONG, 2005). Outras patologias humanas também têm motivado o estudo da ACC e sua regulação, tais como infecções microbianas, diabetes e o câncer.

Fatores ambientais e tecnológicos também visam explorar o conhecimento sobre a ACC e sua regulação, como o desenvolvimento de herbicidas e biocombustíveis. A produção de lipídeos e seus derivados por plantas e microorganismos têm sido amplamente estudados com o intuito de aplicações na produção de ácidos graxos poliinsaturados, biocombustíveis e bioplásticos (SCHIRMER *et al.*, 2010; HUERLIMANN e HEIMANN, 2013; BOKINSKY *et al.*, 2011; HOWARD *et al.*, 2013; LENNEN e PFLEGER, 2012).

Há um grande número de compostos naturais e artificiais descritos capazes de inibir seletivamente a ACC de humanos, plantas, bactérias e fungos. Tais compostos de maneira geral ligam-se especificamente à uma subunidade interferindo direta ou indiretamente nos sítios ativos da ACC. Pequenas diferenças estruturais e entre as sequências de aminoácidos possibilitam a seletividade dos compostos inibidores para com as ACC de humanos, plantas, bactérias e fungos (LUO *et al.*, 2012). Compostos com afinidade a determinadas sequências de resíduos de aminoácidos de ACC vem sendo desenvolvidos com base no seu conhecimento estrutural e regulatório. Por isso é importante estudar os mecanismos bioquímicos da ACC sobre os quais há um limitado conhecimento em bactérias.

O desenvolvimento de biocombustíveis provenientes de *E. coli* é uma possível solução para a minimização da dependência dos combustíveis fósseis. Os biocombustíveis atuais (álcoois e diesels) necessitam de dispendioso processamento e não possuem total compatibilidade com os motores de combustão que predominam no mercado (NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY, 2009; YÜKSEL e YÜKSEL, 2004; HANDKE, LYNCH e GILL, 2011). A produção de biocombustível idêntico estrutural e quimicamente a hidrocarbonetos de origem petrolífera em *E. coli* é considerada muito promissora. Explorando o rol de ácidos graxos livres produzidos é possível desvia-los para biossíntese de alcanos por engenharia genética (HOWARDS *et al.*, 2013). A superexpressão de ACC em *E. coli* aumentou em até 100 vezes a quantidade de malonil-CoA e 6 vezes a produção de

ácidos graxos livres (DAVIS e CRONAN JR *et al.*, 2001). Além disso, a estreita regulação da taxa BC:BCCP parece ser crucial para o crescimento de *E. coli* e produção de ácidos graxos (ABDEL-HAMID e CRONAN JR, 2007). Por isso, conhecendo-se melhor os princípios bioquímicos de regulação dessas subunidades da ACC seria possível aumentar consideravelmente o rendimento da produção de ácidos graxos e, conseqüentemente, de biocombustíveis.

1.2.1 Subunidades da acetil-CoA carboxilase

1.2.1.1 Biotina carboxilase – BC

A biotina carboxilase é a subunidade da acetil-CoA carboxilase que catalisa a carboxilação dependente de biotina ligada a BCCP. A reação ocorre, primeiramente, pela desprotonação do bicarbonato e ataque ao fosfato- γ do ATP, gerando ADP e um carboxifosfato. A decomposição deste intermediário produz fosfato inorgânico e CO_2 . Em seguida, o átomo N1 da biotina é desprotonado por um óxido de fosfato, possibilitando o ataque de um CO_2 à este átomo gerando, assim, a carboxi-biotina ligada a BCCP. Depois disso a reação segue pela translocação da carboxi-biotina para o sítio ativo da CT, a qual vai descarboxilar a biotina e transferir o CO_2 para o acetil-CoA gerando malonil-CoA (FIGURA 4) (TONG, 2005).

BC possui atividade catalítica independente das demais subunidades (WALDROP *et al.*, 1994) e é capaz de hidrolisar ATP lentamente na ausência de biotina. No entanto, a hidrólise de ATP por BC somente ocorre quando complexada às outras subunidades BCCP e CT na presença de acetil-CoA, e assim, impedindo a hidrólise desnecessária de ATP (BROUSSARD *et al.*, 2013a). Na presença de BCCP, ou biotina, BC sofre uma modificação conformacional que aumenta a hidrólise de ATP em 1100 vezes (BLANCHARD *et al.*, 1999).

A proteína BC é homodimérica e cada monômero é constituído por 449 resíduos de aminoácidos (49,4 kDa) e possui os domínios N-terminal, o domínio B e o domínio C-terminal. O domínio N-terminal é composto por cinco fitas de folhas β -pregueadas paralelas flanqueadas por quatro α -hélices (WALDROP *et al.*, 1994). O domínio B é uma porção muito flexível da proteína que se estende à porção globular da proteína dobrando-se em duas cadeias α -hélices e três folhas- β (THODEN *et al.*, 2000). O domínio C-terminal faz parte da porção globular da proteína e possui oito

cadeias folhas- β anti-paralelas, três cadeias menores folhas- β antiparalelas e sete α -hélices (FIGURA 5) (WALDROP *et al.*, 1994).

O sítio de ligação do ATP em BC de *E. coli* pode ser dividido em 3 diferentes regiões, à região de ligação da adenina (1), a região de ligação da ribose (2) e a região de ligação do grupo fosfato (3). A região de ligação da adenina abrange aos resíduos dos aminoácidos E201, L294, I157-K159, L278 e I287. A região de ligação da ribose é composta pelos resíduos H209, Q233, H236 e H438. E na região de ligação dos fosfatos estão envolvidos os resíduos K116, K159 e a volta rica em glicina (resíduos 161 e 168). Esses resíduos de BC são conservados em várias espécies de bactérias. BC é uma proteína dimérica e a interface de ligação entre seus monômeros envolve a arginina 331, que fica estendida uma em direção a outra na estrutura cristalina (MOCHALKIN *et al.*, 2008).

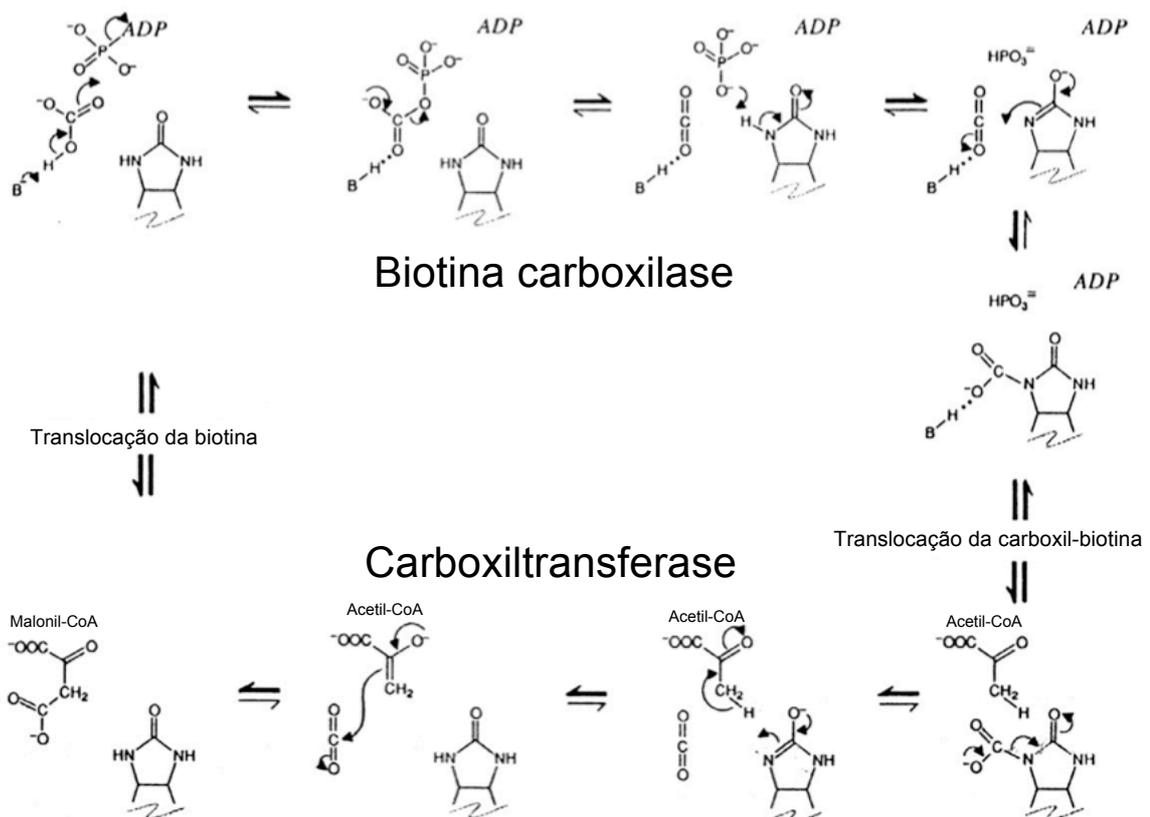


FIGURA 4 – Mecanismo da reação catalisada pela ACC de *E. coli*
 FONTE: Tong (2005)

Os resíduos de aminoácidos importantes para interagir com o bicarbonato são o R292, o V295 e o E296, que interagem com os átomos de oxigênio 1, 2 e 3 do bicarbonato respectivamente. Por sua vez os resíduos Y82, V295 e R338 parecem ser importantes para a interação da biotina com o sítio ativo de BC. O íon magnésio

está em interação com os resíduos E276 e E288 na estrutura de cristal de BC na presença de MgADP (CHOU, YU e TONG, 2009).

A estrutura de cristal de BC revelou dois íons Mg^{2+} no sítio de ligação do ATP (MOCHALKIN *et al.*, 2008). A interface dimérica é formada pelos domínios C-terminais. BC pode-se dizer que se apresenta sob duas formas, uma aberta e não catalítica e outra fechada e catalítica ligada ao ATP. A forma fechada é induzida pela ligação do ATP no sítio de ligação, gerando uma rotação de 45° do domínio B para dentro da estrutura (MOCHALKIN *et al.*, 2008).

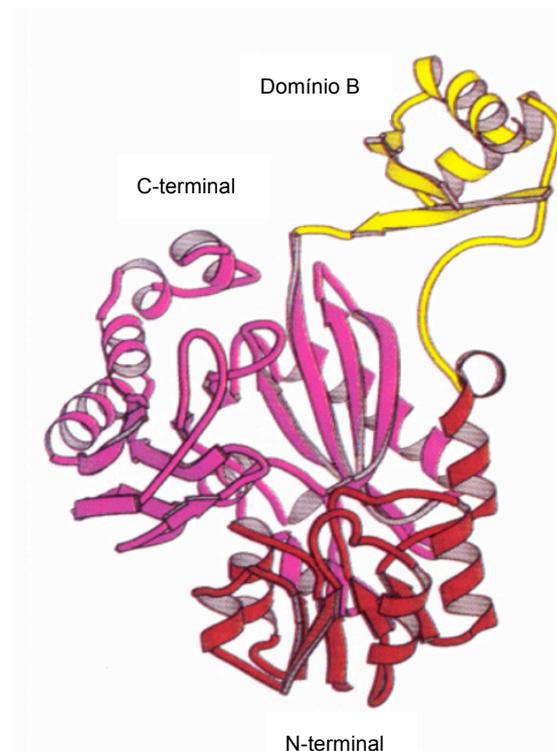


FIGURA 5 – Estrutura geral de BC de *E. coli*

Os domínios da enzima BC estão representados em diferentes cores. Em vermelho o N-terminal, em rosa o C-terminal e em amarelo o domínio B .

FONTE: Waldrop *et al.* (1994)

1.2.1.2 Carboxiltransferase – CT

O componente da ACC que catalisa a transferência do grupo carboxil ligado à biotina para o acetil-CoA é a proteína CT. Após a translocação da carboxi-biotina ao sítio ativo da CT, ocorre a descarboxilação da carboxil-biotina, deixando o átomo N1 da biotina livre para desprotonar o grupo metil do acetil-CoA (FIGURA 4).

Na figura 6, está representada a estrutura de cristal de CT que confirmou a estrutura heterotetramérica de CT ($\alpha_2\beta_2$). A estrutura geral do tetrâmero é uma pirâmide triangular truncada em sua base. O oligômero é um dímero de dímeros ligados por um eixo que atravessa uma cavidade central e se estreita gradualmente a partir de uma abertura de um diâmetro de 13 Å e uma profundidade de 23 Å com a superfície inacessível ao solvente. As subunidades α e β são estruturalmente homólogas o que sugere que sejam originadas de duplicação gênica e convergência a partir de um ancestral com uma CT monomérica (BILDER *et al.*, 2006).

A carboxiltransferase possui atividade catalítica independente das demais subunidades da ACC (WALDROP *et al.*, 1994). A porção CT é composta pelas subunidades α e β . Em *E. coli* CT forma um heterotetrâmero composto por 2 subunidades α de 319 aminoácidos (35,1 kDa) e 2 subunidades β de 304 aminoácidos (33,2 kDa) (BILDER *et al.*, 2006). Tanto a subunidade α quanto β são formadas por um núcleo de repetidos motivos β - β - α . Além disso, a subunidade β possui em sua porção N-terminal uma estrutura em dedo de zinco (domínio Zn) (FIGURA 6). Há 4 subdomínios (HS1 α , HS2 α , HS1 β e domínio de Zn) representados na figura 6, estes podem servir como um controle de tráfego na plataforma catalítica dos substratos e produtos (BILDER *et al.*, 2006).

O domínio Zn permite a CT ligar-se inespecificamente ao DNA e à heparina (BENSON *et al.*, 2008). A CT se liga de forma específica ao mRNA codificante das subunidades α e β , regulando a própria tradução. Mutações nas cisteínas 27, 30, 46 e 49 do domínio dedo de zinco diminuíram a atividade catalítica e a ligação a mRNA. Acredita-se que essa capacidade de regulação da própria tradução ocorra em resposta ao status celular de acetil-CoA (FIGURA 7) (MEADES *et al.*, 2010).

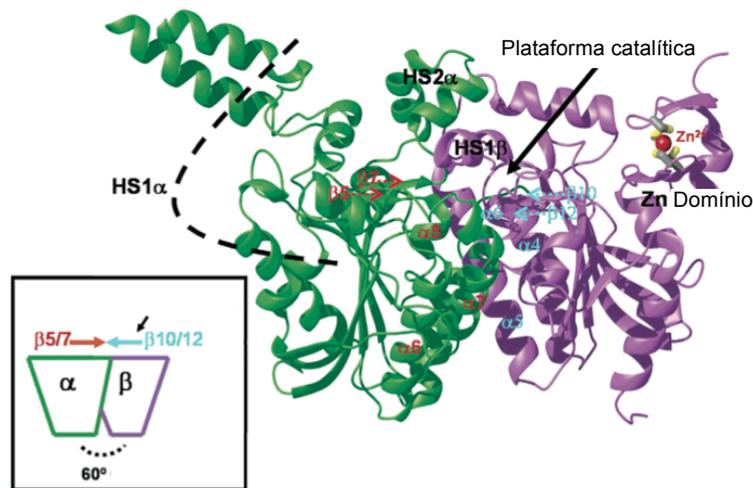


FIGURA 6 – Estrutura geral de CT α e β de *Staphylococcus aureus*

Cada monômero está representado em diferentes cores (em verde a subunidade α e em roxo a β). A plataforma catalítica representada é formada pelas cadeias folhas- β 5 e 7 na subunidade α e 10 e 12 da subunidade β . A linha tracejada representa o suposto deslocamento da região HS1 α (HS – Subdomínios Helicoidais).

FONTE: Bilder *et al.* (2006)

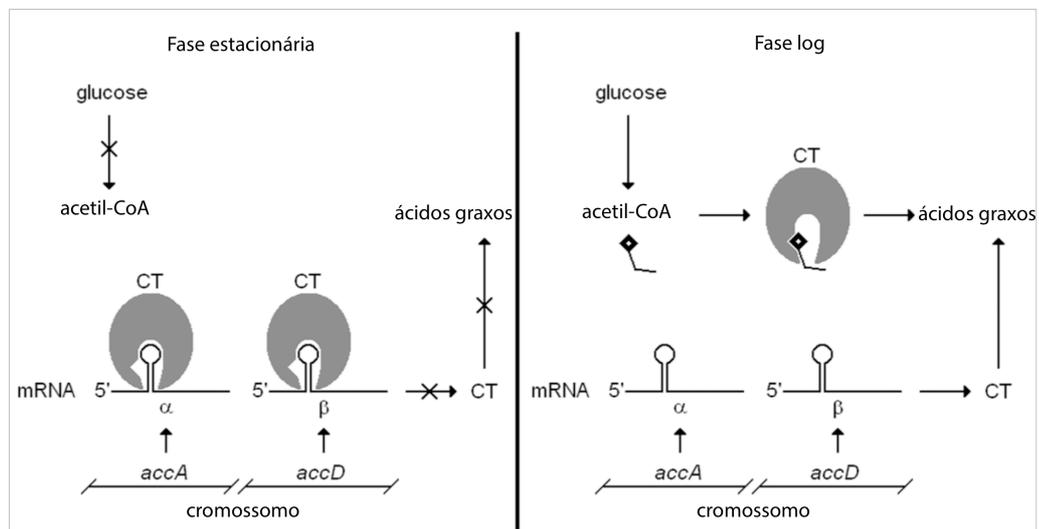


FIGURA 7 – Esquema da autoregulação da transcrição da CT de *E. coli*

FONTE: Meades *et al.* (2010)

Durante a fase estacionária, quando a síntese *de novo* de ácidos graxos é desnecessária, o nível de glicose é baixo e assim o nível de acetil-CoA também é baixo. O baixo nível de acetil-CoA permite que a CT ligue-se ao mRNA para a própria transcrição, das suas subunidades α e β . Nesse estado a ACC tem sua atividade controlada a nível traducional. Por sua vez, durante a fase log, a biogênese da membrana se faz necessária e nesse momento celular a glicose é abundante, logo, acetil-CoA torna-se abundante e liga-se a CT desligando-a do mRNA próprio e assim, permitindo a transcrição das subunidades da CT α e β . Deste modo, a ACC pode atuar na síntese de ácidos graxos em uma rápida resposta ao estado metabólico celular (FIGURA 7) (MEADES *et al.*, 2010).

Os resíduos de aminoácidos importantes envolvidos na interface entre as subunidades α e β são I181, L185 e L209 no monômero α e L174, M177 e A208 no monômero β . Dois conservados resíduos são encontrados no sítio ativo, G204 e G205 (BILDER *et al.*, 2006), estes formam uma fenda oxianion que é tida como importante para estabilizar um intermediário enolato formado durante a descarboxilação da carboxil-biotina na CT homóloga da propionil-CoA carboxilase (PCC) em *Streptomyces coelicolor* (DIACOVICH *et al.*, 2004).

As duas subunidades de CT se arranjam de tal forma que formam dois sítios ativos em faces opostas da proteína, sendo que a subunidade α liga-se à biotina e a subunidade β liga-se ao acetil-CoA, formando uma cavidade central que se estreita gradualmente (23 – 13 Å) e simetricamente em direção ao interior da proteína (FIGURA 7) (BILDER *et al.*, 2006). A proteína CT é pertencente à superfamília das crotonases, que caracteristicamente são dímeros de dímeros que se arranjam simetricamente a formar uma superhélice β - β - α que tem como função estabilizar ânions enolato, intermediário de substrato acil-CoA (HOLDEN *et al.*, 2001). Os resíduos de aminoácidos que estabilizam os oxianions são as glicinas 206 e 207 da subunidade α e as glicinas 204 e 205 da subunidade β (BILDER *et al.*, 2006).

1.2.1.3 Proteína carreadora de carboxil-biotina – BCCP

A proteína carreadora de carboxil-biotina (BCCP) é a subunidade da ACC encarregada de carrear a biotina, do sítio ativo de BC para o de CT, para possibilitar a ligação de um grupo carboxil à biotina e então transferi-lo para o acetil-CoA formando o produto final malonil-CoA (FIGURA 8).

A BCCP sofre uma modificação covalente pós-traducional necessária à sua atividade. Essa modificação é a ligação da biotina no resíduo do aminoácido lisina 122. Essa reação é catalisada pela enzima BirA ou proteína biotina ligase (BPL). Em *Escherichia coli* a BCCP é a única proteína biotilada (CHAPMAN-SMITH e CRONAN JR, 1999a). A BirA é uma proteína monomérica de 35 kDa que possui sua estrutura tridimensional parcialmente determinada pois muitas regiões não foram bem definidas na estrutura cristalina (WILSON *et al.*, 1992). A reação de biotilação ocorre em 2 etapas: na primeira etapa a BirA catalisa o ataque do oxigênio carboxilato da biotina no fosfato α do ATP, formando pirofosfato e biotinoil-AMP, também chamado de biotinoil-adenilato. Na segunda etapa o grupo ϵ -amino da lisina 122 da BCCP é atacado nucleofilicamente pelo átomo do carbono anidrido formado, liberando o AMP e, assim, formando a ligação amida que une covalentemente a biotina à lisina da BCCP (CHAPMAN-SMITH e CRONAN JR, 1999b).

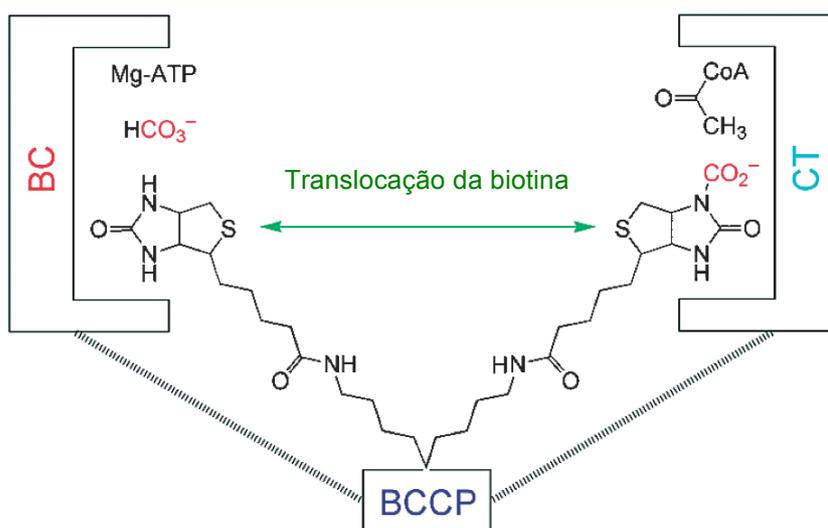


FIGURA 8 – Esquema da translocação da biotina por BCCP
 FONTE: Tong (2005)

A BCCP é constituída por 156 resíduos de aminoácidos (16,7 kDa) e possui o domínio C-terminal bastante conservado. A estrutura C-terminal de BCCP é conhecida por difração de raio-X (ATHAPPILLY e HENDRICKSON, 1995) e por RMN (YAO *et al.*, 1997). Já a porção N-terminal não é bem conhecida, aparentemente sua estrutura não pôde ser determinada devido à alta flexibilidade. Acredita-se que tal mobilidade se dá devido à presença de uma região rica em prolina-arginina (CRONAN JR e WALDROP, 2002).

O domínio C-terminal de BCCP de *E. coli* teve seus 87 resíduos de aminoácidos (BCCP87) terminais super-expresso e purificado (CHAPMAN-SMITH e CRONAN JR, 1999b). Esse domínio foi biotilado e apresentou 100% de atividade comparado com a BCCP intacta (NENORTAS e BECKETT, 1996), confirmando que C-terminal é o domínio catalítico de BCCP. Estudos com esta construção revelaram uma estrutura β -sanduíche formada por dois conjuntos de quatro folhas- β antiparalelas (ATHAPPILLY e HENDRICKSON, 1995).

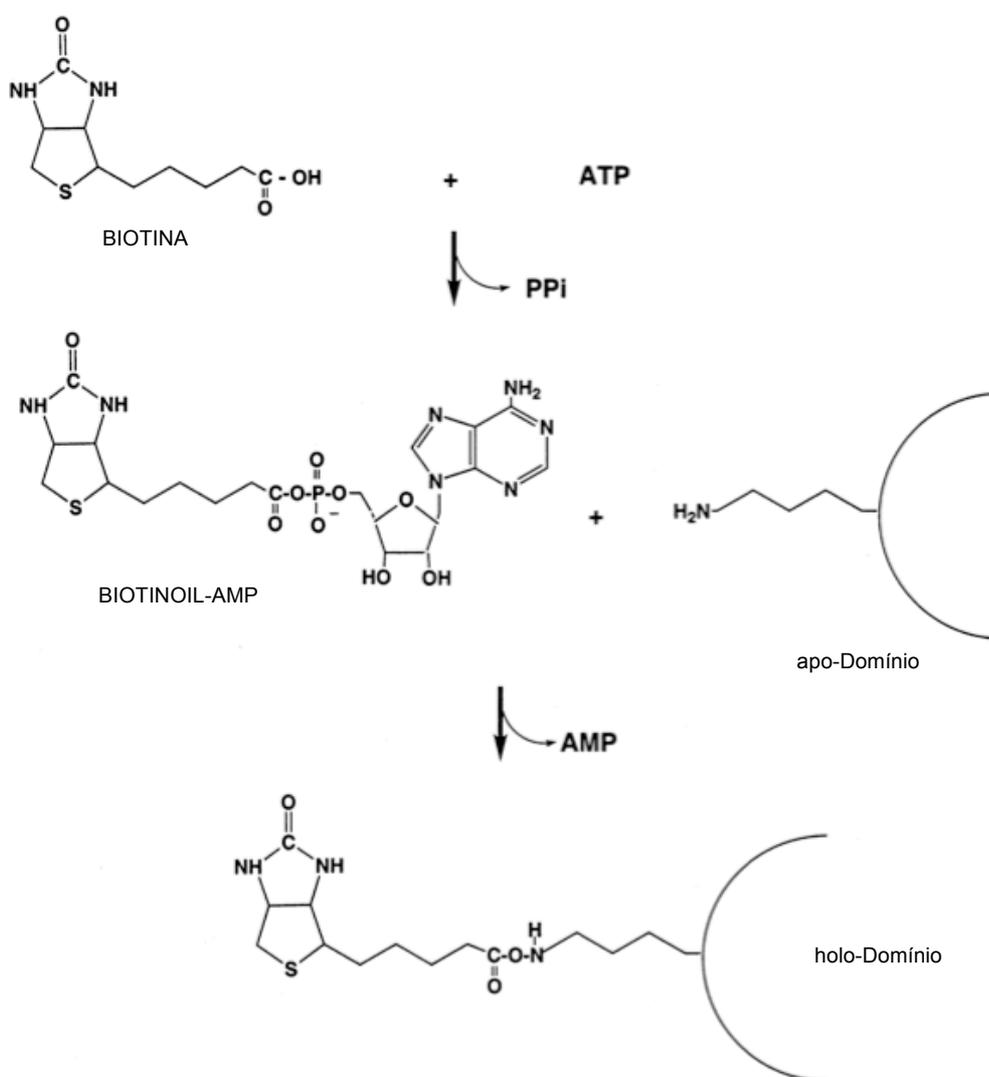


FIGURA 9 – Esquema da reação de biotilação de BCCP catalisada pela BirA de *E. coli*
 FONTE: Chapman-Smith e Cronan Jr (1999a)

O domínio C-terminal da BCCP de *E. coli* possui duas regiões importantes, a β -hairpin turn e a thumb. É em β -hairpin turn que há uma seqüência de aminoácidos bastante conservada na qual o resíduo de lisina (122) é o que recebe a biotina covalentemente por meio da ação enzimática de BirA (CHAPMAN-SMITH e CRONAN JR, 1999a). Estudos de RMN da BCCP87 sugeriram que a biotina interage com a região thumb em seus resíduos 95-100, causando uma mudança conformacional (ROBERTS *et al.*, 1999). O domínio thumb é uma estrutura bastante característica de Bactéria que se projeta para fora do corpo do domínio C-terminal da BCCP (ATHAPPILLY e HENDRICKSON, 1995; ROBERTS *et al.*, 1999). Estudos com proteína BCCP mutante para a região thumb mostraram perda de crescimento em cultura (CRONAN JR e WALDROP, 2002).

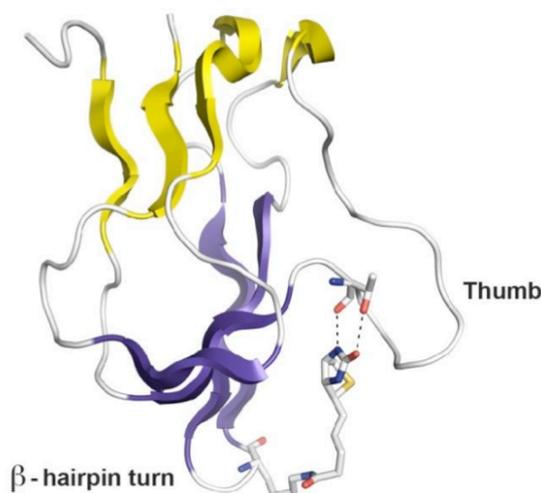


FIGURA 10 – Estrutura geral de BCCP C-terminal de *E. coli*

Estrutura β -sanduíche formado por dois grupos (em amarelo e roxo) de quatro cadeias folhas- β . A biotina ligada a lisina 122 na região β -hairpin turn está curvada interagindo com a treonina 94 na região thumb. Cores dos átomos envolvidos na interação biotina treonina 94: carbono (branco), nitrogênio (azul), oxigênio (vermelho), enxofre (amarelo)

FONTE: baseado em Athappilly e Hendrikson, 1995 por Broussard (2013).

BCCP forma um estável complexo com BC que podem ser co-purificado (CHOI-RHEE e CRONAN JR, 2003). A estrutura de cristal do complexo BC-BCCP mostrou uma proporção de 1:2, ou seja, um dímero de BC para 4 monômeros de BCCP. No complexo BC-BCCP em estrutura de cristal não foi possível obter a estrutura do domínio N-terminal de BCCP, somente o C-terminal o qual estava em

interação com BC. A importante região *thumb* de BCCP apresentou-se exposta, voltada para o solvente e a região β -*hairpin turn* parte em interação com BC e em parte exposta (FIGURA 11) (BROUSSARD *et al.*, 2013a).

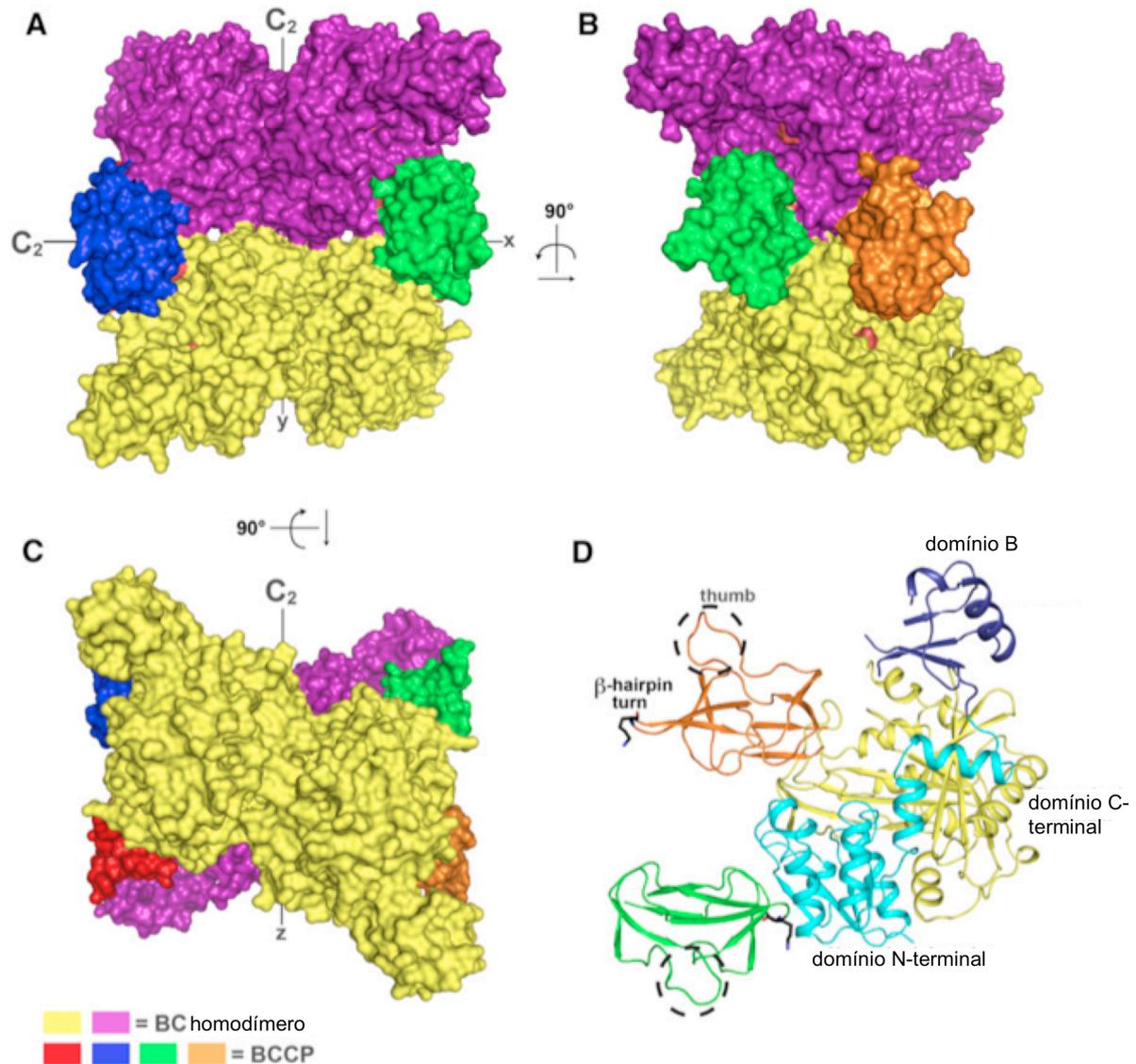


FIGURA 11 – Estrutura geral do complexo BC-BCCP de *E. coli*

A-C) Estrutura quaternária do complexo BC-BCCP (2:4 monômero). Um homodímero de BC está em purpura e outro em amarelo. A BCCP (C-terminal) está em azul e outra em verde; B) é o esquema da estrutura A rotacionada à esquerda 90°C, revelando outra BCCP em laranja; C) é A rotacionada 90°C para cima, no eixo x, revelando outra BCCP em vermelho; D) Representação da estrutura de BC-BCCP (1:2 monômero) revelando as duas interfaces de interação entre BC e BCCP. Uma BCCP está em laranja e outra em verde. Azul claro, amarelo e azul escuro são os domínios N-terminal, C-terminal e domínio B de um monômero de BC.

FONTE: Broussard *et al.* (2013a)

A interação do domínio C-terminal da BCCP com BC ocorre entre duas diferentes interfaces de BC, uma é o domínio N-terminal (1) e outra envolve os C e N-terminal (2) de BC. Na interface de interação de BCCP com o domínio N-terminal de BC, os resíduos de aminoácidos C50 de BC interagem com os F148 e E147 de BCCP. Este resíduo E147 de BCCP interage também com os resíduos H32 e T48 de BC. Na segunda interface, em que BCCP interage com os domínios C e N-terminal de BC, o resíduo D149 de BCCP interage com o Y380 de BC, as demais interações foram mostradas ocorrendo por intermédio de um íon sulfato e uma molécula de água, provenientes da solução de cristalização $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M). Os resíduos envolvidos nessas interações são os I82 e R84 de BCCP e os S56 (N-terminal) e Y381 (C-terminal) de BC (BROUSSARD *et al.*, 2013a).

1.3 Biossíntese de ácidos graxos e a regulação da ACC

A ACC catalisa a primeira e irreversível etapa da síntese de ácidos graxos. Na biossíntese de ácidos graxos, o acetil-CoA, proveniente de diversas fontes de carbono, é convertido a malonil-CoA pela catálise da ACC. O malonil-CoA, em *E. coli*, é exclusivamente direcionado a biossíntese de ácidos graxos. A malonil-CoA:ACP transacilase (FabD) forma o malonil-ACP (ACP – Acyl Carrier Protein), que sofre a adição de um grupo acetil catalisado pela enzima β -cetoacil-ACP sintase III (FabH) na primeira etapa de alongamento da cadeia lipídica, formando acetoacetyl-ACP. Acetoacetyl-ACPs e subsequentemente cetoacil-ACPs (fase de alongamento) são reduzidos pela enzima β -cetoacil-ACP redutase (FabG) gerando 3-hidroxiacil-ACP, o qual é desidratado por β -hidroxiacil-ACP desidratase (FabZ), para gerar enoil-ACPs que são reduzidos pela enoil-ACP redutase (FabI) resultando finalmente em acil-ACPs saturados. Para alongamento da cadeia dos acil-ACPs, estes são condensados ao malonil-ACP pelas enzimas β -cetoacil-ACP sintase I ou II (FabH ou FabF) para alongamento em 2 carbonos por rodada. A partir dos acil-ACPs, por meio da acil-ACP tioesterase (TE), podem ser formados ácidos graxos livres que poderão ser incorporados aos fosfolipídeos pela ação de aciltransferases para a síntese de membrana celular (FIGURA 12) (LENNEN e PFLEGER, 2010; LENNEN e PFLEGER, 2012).

Quando há abundante suprimento exógeno de lipídeos, a *E. coli* pode utilizar

a via da β -oxidação para gerar carbono e energia quando acoplado ao ciclo do ácido cítrico, mas *E. coli* prefere outras fontes de carbono, como a glicose. A regulação da síntese e degradação de ácidos graxos ocorre em dois níveis. No primeiro, o sistema de repressão do catabolismo dependente de AMP cíclico (cAMP) é que controla a expressão dos genes *fad* (genes da via de degradação de ácidos graxos) e no segundo, o específico mecanismo de regulação é comandado pelo fator de transcrição FadR. FadR reprime a transcrição dos genes de transporte, ativação e β -oxidação e ativa os genes para a biossíntese de ácidos graxos insaturados (LENNEN e PFLEGER, 2012; IRAM e CRONAN JR, 2006; CAMPBELL e CRONAN, 2001; CAMPBELL, MORGA-KISS e CRONAN JR, 2003; HANRY e CRONAN JR, 1992).

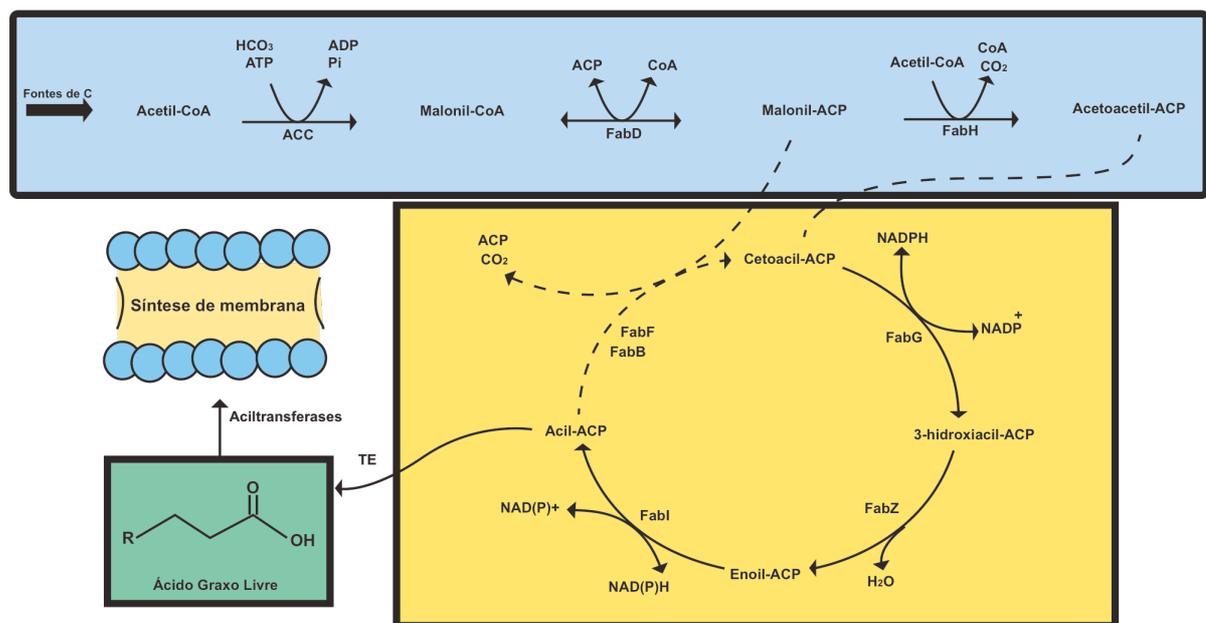


FIGURA 12 – Via metabólica da síntese de ácidos graxos em *E. coli*

FONTE: O autor (baseado em LENNEN e PFLIGER, 2013; LENNEN e PFLIGER, 2010)

A biossíntese de ácidos graxos em *E. coli* é bem compreendida, no entanto, o conhecimento sobre a regulação da ACC é limitado. Sabe-se que último produto da via biossintética de ácidos graxos, o acil-ACP de cadeia longa, é capaz de inibir a ACC de maneira dose-dependente. Isso foi demonstrado por Davis e Cronan Jr, 2001, usando palmitoil-ACP (o acil-ACP mais abundante em *E. coli*), verificando até

60-70% de inibição da ACC de *E. coli*.

A ACC de procariotos pode ser regulada a nível transcricional. A superexpressão de BCCP causa inibição da transcrição do operon *accBC*, que expressa as proteínas BCCP e BC. A inibição observada foi de 90% comparada com a célula na qual a BCCP não foi induzida. E ainda, após indução da porção N-terminal de BCCP, foi verificada inibição da transcrição de até 96%, por outro lado, a superexpressão da porção C-terminal da BCCP não mostrou inibição. Assim, permite-se concluir que a região N-terminal de BCCP é responsável por inibir o operon *accBC* (JAMES e CRONAN JR, 2004). Tem sido mostrado que, aparentemente, a expressão dos genes *acc* é reduzida em fase estacionária, mas a regulação da expressão das subunidades parece ocorrer por mecanismos ainda desconhecidos (LI e CRONAN JR, 1993; TONG, 2005).

Em mamíferos, a ACC é regulada por citrato, por acil-ACP de cadeia longa e por específica fosforilação de diversos resíduos de serina. Quando o citrato está em mais altos níveis celulares, ele ativa a atividade da ACC, promovendo a polimerização da ACC, por outro lado, o acil-CoA quando em grande concentração inibe a polimerização da ACC de mamíferos. A fosforilação da ACC ocorre pela ação da proteína quinase AMP-ativada (AMPK). AMPK pode fosforilar as duas isoformas, ACC1 e ACC2, sob condições fisiológicas, inibindo significativamente a atividade dessas enzimas, diminuindo a velocidade máxima e dessensibilizando as ACC quanto a ativação por citrato. A AMPK atua nos resíduos de fosforilação S79, S1200 e S1215 em ACC1 e 218 em ACC2. Além da AMPK, a proteína kinase A (PKA) também pode fosforilar as ACCs, mas a AMPK é a mais importante reguladora metabólica em mamíferos que agem em resposta a uma variedade de sinais, como de estresse e de exercício, fosforilando uma série de proteínas e comandando a inibição de vias de consumo de ATP, como a biossíntese de ácidos graxos (JANOVSKÁ *et al.*, 2008; KIM, LEE e KIM, 2003; HARDIE e PAN, 2002; MUNDAY, 2002; WAKIL e ABU-ELHEIGA, 2009; TONG, 2005).

Ambas ACC1 e ACC2 de mamíferos são controladas também ao nível transcricional por inúmeros promotores, os quais são controlados pela dieta e hormônios. Uma dieta livre de lipídeos tornam as ACCs mais ativas e a privação de alimento ou diabetes tornam as ACCs menos ativas. Dieta rica em carboidratos induz a transcrição da ácido graxo sintetase (FAS), ACC1 e ACC2. A dieta está relacionada a ação de fatores de transcrição que atuam em resposta aos hormônios

insulina e glucagon (KIN, 1997; WAKIL e ABU-ELHEIGA, 2009; PÉGORIER, MAY e GIRARD, 2004). A ACC1 possui 3 principais promotores, os promotores PI, PII e PIII, os quais são ativados pelos hormônios triiodotironina e reprimidos por colesterol (MAO, CHIRALA e WAKIL, 2003). A ACC2 possui 2 promotores, o promotor I regula a expressão tecido específica de ACC e o promotor II tem a regulação mediada por fatores miogênicos, como o Myo D e o fator músculo regulatório 4 (MRF4) (KIM, LEE e KIM, 2003).

A ACC de planta recentemente teve descrita uma forma de regulação por meio da interação com a proteína PII. A interação entre PII e ACC em *Arabidopsis thaliana* foi demonstrada utilizando um sistema de cromatografia de afinidade à PII, em que uma PII com cauda de hisdidina foi imobilizada em uma coluna de níquel, a qual foi incubada com extrato proteico de cloroplasto na presença de MgATP. As proteínas ligadas à PII foram seletivamente eluídas com MgATP e MgATP mais 2-OG. Análise em SDS-PAGE e por espectrometria de massa apontaram seis proteínas como ligantes potenciais de PII: NAGK (uma proteína alvo de PII já bem conhecida) e cinco proteínas com domínio biotinoil. Duas dessas são chamadas BCCP1 e BCCP2. BCCP 1 e 2 são isoformas de BCCP, subunidade da heteromérica ACC plastidial. Foi verificado também que a atividade da ACC em extrato de cloroplastos foi inibida cerca de 50% por PII na presença de MgATP. Na presença de MgATP combinado com 2-OG a atividade da ACC foi restaurada. O 2-OG causou a reversão da inibição da ACC por PII, provavelmente pelo seu efeito negativo na interação entre BCCP e PII. Sob concentração de 0,08 mM de 2-OG a atividade da ACC foi restabelecida em 50% na presença de PII (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010), mostrando que 2-OG parece ser o principal sinal de controle da interação ACC-PII. Este trabalho foi o primeiro a mostrar que PII pode atuar regulando uma enzima dedicada ao metabolismo de carbono.

Levando em conta que as proteínas PII e ACC são bastante conservadas entre os seres vivos e que as proteínas ACC e PII de planta foram originadas em procariotos, neste trabalho, foi hipotetizado que a interação entre PII e BCCP fosse um evento conservado em bactéria. Esta hipótese foi confirmada usando *Escherichia coli* como organismo modelo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi identificar a interação entre as proteínas PII e a enzima ACC em *E. coli* e estudar o papel desta interação sobre a atividade da enzima ACC

2.2 Objetivos específicos

- Construir plasmídeos capazes de expressar as proteínas PII, GlnB e GlnK de *E. coli* com cauda de histidina N-terminal e sem cauda de histidina.
- Construir plasmídeo capaz de expressar BCCP em sua forma nativa.
- Expressar e purificar as subunidades da enzima ACC assim como as proteínas PII de *E. coli*.
- Biotinilar BCCP *in vitro* e purificar a proteína modificada.
- Determinar interações entre as proteínas PII e BCCP de *E. coli in vitro*.
- Estudar a influência dos metabólitos ATP, ADP e 2-OG na interação PII-BCCP.
- Determinar o efeito das proteínas GlnB e GlnK na atividade da enzima ACC de *E. coli in vitro*.

3 JUSTIFICATIVA

As proteínas PII de *E. coli* são as proteínas mais bem estudadas entre as PII e *E. coli* é provavelmente o organismo mais bem conhecido em toda a biologia. As proteínas da família PII são proteínas altamente conservadas com funções correspondentes em diversos organismos (LEOPOLD *et al.*, 2011; MERRICK e EDWARDS, 1995; FORCHHAMMER, 2008; LEIGH e DODSWORTH, 2007). PII possui sítios conservados de ligação para os efetores 2-oxoglutarato, ATP e ADP, dessa forma PII é capaz de sensoriar mudanças dos níveis desses efetores e transmitir tais sinais por meio de interação com proteínas alvo (HUERGO, CHANDRAN e MERRICK, 2012). Portanto, as proteínas PII são consideradas proteínas chave integradoras de vias metabólicas, reguladoras do metabolismo de nitrogênio, carbono e energia.

O 2-oxoglutarato foi recentemente descrito como sendo um metabólito muito importante na regulação da transcrição global em *E. coli*. Os níveis de 2-oxoglutarato regulam, de forma ainda não conhecida, os níveis de cAMP e, conseqüentemente, a repressão catabólica (YOU *et al.*, 2013). Além disso, o 2-oxoglutarato é um metabólito capaz de sinalizar insuficiência de nitrogênio e suficiência de carbono (NINFA e ATKSON, 2000; NINFA e JIANG, 2005; COMMICHAU *et al.*, 2006; YOU *et al.*, 2013). Uma possível conexão entre o metabolismo de carbono e as proteínas PII foi sugerida pela identificação de uma subunidade da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), a proteína carreadora de carboxil-biotina (BCCP) de *A. thaliana*, como sendo uma proteína alvo de PII (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010). A ACC é uma enzima dedicada ao metabolismo de carbono e é encontrada em todos os domínios da vida, exceto archaea (CRONAN JR e WALDROP, 2002). A BCCP possui, em seu domínio C-terminal, alto nível de similaridade entre os diversos organismos (CHAPMAN-SMITH *et al.*, 1998a; TONG, 2005). Acredita-se que a ACC de plantas tenha origem da ACC de bactérias por meio dos eventos de endossimbiose que originaram os cloroplastos (HUANG *et al.*, 2002; CRONAN JR e WALDROP, 2002). Diante desse contexto, este trabalho foi dedicado à verificação da hipótese de que a interação entre PII e BCCP fosse um evento conservado também em bactérias.

O estudo da interação PII-BCCP, além de possibilitar maior compreensão da regulação e integração dos metabolismos de carbono e nitrogênio, é importante devido a fatores de saúde pública, tecnológicos e ambientais. Nos últimos anos, a

ACC tem sido alvo de estudos que visam o desenvolvimento de herbicidas na agricultura e antibióticos na microbiologia clínica. Além disso, a ACC tem sido alvo de estudos para o desenvolvimento de drogas contra doenças humanas, tais como infecções microbianas, diabetes, obesidade e câncer (LUO *et al.*, 2012). Estudos que visam o desenvolvimento de biocombustíveis também têm sido direcionados a enzima ACC de *E. coli*, que é considerada muito promissora na produção de hidrocarbonetos em larga escala, com alto rendimento e alto valor óleo-químico (LENNEN e PFLEGER, 2012; HOWARD *et al.*, 2013; HANDKE *et al.*, 2011). É conhecido que a superexpressão de ACC em *E. coli* aumenta significativamente a produção de ácidos graxos e a regulação da taxa de BC:BCCP é bastante importante para o crescimento de *E. coli* (DAVIS e CRONAN JR, 2001; ABDEL-HAMID e CRONAN JR, 2007). Desta forma, conhecendo melhor a regulação de ACC por PII em *E. coli* possibilitaria aumentar o rendimento da produção de ácidos graxos e seus derivados de aplicação biotecnológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Meios e condições de cultivo celular

Os meios de cultivo para estirpes de *E. coli* foram baseados em meio líquido LB. Para cultivo em meio sólido foi utilizado meio LA (LB acrescido de agar) (SAMBROOK, *et al.*, 1989). O cultivo celular foi realizado em agitador a 180 rpm a 37°C. Os cultivos foram realizados a partir de pré-inóculo 1:100 na presença de antibióticos.

4.2 Plasmídeos e células

As células e plasmídeos usados neste trabalho estão listados na tabela 1, abaixo:

Tabela 1 – Células e plasmídeos:

Linhagens/Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
<i>E. coli</i>		
DH10B	Sm ^r ; F ⁺ [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> M15]	Invitrogen
ET8000	rbs <i>lacZ</i> ::IS1 <i>gyr</i> A <i>hutC</i> (selvagem)	McNeil <i>et al.</i> , 1982
BL21 (λ DE3)	Expressa T7 RNA polimerase	Agilent
Plasmídeos		
pET28a	Km ^r . Vetor de expressão, promotor T7	Novagen
pET29a	Km ^r . Vetor de expressão, promotor T7	Novagen
pET16 <i>baccAD</i>	Amp ^r (pET16b). Expressa o operon <i>accAD</i> de <i>E. coli</i> com cauda ₆ His na porção N-terminal de CT (α e β)	(Soriano <i>et al.</i> , 2006)
pET16 <i>baccC</i>	Amp ^r (pET16b). Expressa <i>accC</i> de <i>E. coli</i> com cauda ₆ His na porção N-terminal de BC	(Soriano <i>et al.</i> , 2006)
pET29 <i>accB</i>	Km ^r (pET29a). Expressa <i>accB</i> de <i>E. coli</i> com cauda ₆ His na porção C-terminal de BCCP	(Soriano <i>et al.</i> , 2006)
pCY216	Cm ^r . Expressa BirA <i>E. coli</i> , pelo promotor <i>araBAD</i>	(Chapman-Smith <i>et al.</i> , 1994)
pJT25	Amp ^r (pT7-7). Expressa GlnK de <i>E. coli</i>	(Radchenko <i>et al.</i> , 2010)
pTRPETHisGlnK	Km ^r (pET28a). Expressa GlnK de <i>E. coli</i> com cauda ₆ His na porção N-terminal	Este trabalho
pTRPETBCCPn	Km ^r (pET29a). Expressa BCCP de <i>E. coli</i>	Este trabalho
pTRPETGlnB	Km ^r (pET29a). Expressa GlnB de <i>E. coli</i>	Este trabalho
pMSA3	Km ^r (pET28a). Expressa GlnZ de <i>A. brasilense</i> com cauda ₆ His na porção N-terminal	(Araújo <i>et al.</i> , 2004)
pLMA 4	Amp ^r (pT7-7). Expressa GlnB de <i>A. brasilense</i>	(Araújo <i>et al.</i> , 2004)
pDK601	Amp ^r (pUC18). Expressa GlnB de <i>E. coli</i>	(Van Heeswijk <i>et al.</i> , 1993)

A construção do plasmídeo capaz de superexpressar a proteína His-GlnK de *E. coli* foi feita a partir da clivagem do plasmídeo pJT25 e do vetor pET28a com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e posterior ligação do fragmento *glnB* no pET28a, originando o plasmídeo pTRPETHisGlnK.

A proteína BCCP em sua forma nativa foi superexpressa a partir do plasmídeo pTRPETBCCPn, que foi obtido pela amplificação de *accB* a partir do genoma de *E. coli* k12 com os iniciadores 5' TGGTGGGATCCTTACTCGATGACGACCAGCGGCTC 3' (sítio de restrição *BamHI* sublinhado) e 5' GAACCCACATATGGATATTC GTAAGATTA AAAAAC 3' (sítio de restrição *NdeI* sublinhado). O produto de PCR foi digerido com *NdeI* e *BamHI* e ligado no vetor pET29a digerido previamente com as mesmas enzimas.

Para superexpressar a proteína GlnB de *E. coli* foram utilizados os iniciadores 5' GGAATCATATGAAAAGATTGATGCG 3' (sítio de restrição *NdeI* sublinhado) e 5' CTTGAGGATCCTTAAATTGCCGCCGCGTCGTCC 3' (sítio de restrição *BamHI* sublinhado) para amplificar *glnB* do genoma de *E. coli* ET8000. O produto de PCR foi clivado com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e ligado no vetor pET29a clivado com as mesmas enzimas. Todos os plasmídeos obtidos foram confirmados por sequenciamento.

4.3 Purificação de plasmídeos

Os plasmídeos foram purificados conforme Sambrook *et al.*, 1989. Ou alternativamente purificado com a utilização de kits.

4.4 Transformação bacteriana por choque térmico

O método para transformação bacteriana foi realizado de acordo com Chung *et al.* (1989).

4.5 Amplificação, restrição e ligação de DNA

Reações de PCR foram feitas com iniciadores sintetizados pela Invitrogen, feitas em tampão sugerido pelo fabricante das enzimas Taq polimerase (Invitrogen e Fermentas) com adição de 0,2 mM de dNTPs, 10 pmols de cada iniciador (5' e 3'),

1,5 mM de $MgCl_2$, cerca de 20 ng de DNA molde e 1U de enzima Taq DNA polimerase para um volume final de 25 μL . Os parâmetros de amplificação em termociclador foram 30 ciclos de desnaturação, anelamento e alongamento, os quais possuem parâmetros de tempo e temperatura indicados conforme fabricante dos iniciadores e fornecedores de Taq DNA polimerase (Invitrogen e Fermentas).

Endonucleases de restrição foram utilizadas conforme indicações do fabricante. Foram utilizadas enzimas da Invitrogen e Fermentas.

O vetor plasmidial e o inserto de interesse, ambos clivados com as mesmas enzimas de restrição, foram misturados em uma proporção molar 1:5, respectivamente, em tampão de ligação, no qual foi adicionado 1 unidade enzimática de T4 ligase à mistura e então incubada por pelo menos 16 horas a 18-25°C.

4.6 Eletroforese de DNA

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

4.7 Purificação de proteínas

As células *E. coli* BL21 (λ DE3) portando os plasmídeos para superexpressão das respectivas proteínas de interesse foram cultivadas com inóculo de cultura saturada na proporção de 1:100 e deixadas sob agitação de 180 rpm a 37°C até atingir DO_{600} de 0,5-0,7 para a então adição de IPTG a 0,5 mM e indução por 3 horas, com os antibióticos adequados. Para expressão das proteínas PII o meio LB foi suplementado com 20 mM de NH_4Cl para não permitir a uridililação das proteínas PII superexpressas.

O extrato de proteínas totais livre de células foi confeccionado recuperando-se as células cultivadas por centrifugação a 3400 g por 15 minutos a 4°C após repouso de 30 minutos no gelo. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em tampão de sonicação, o qual foi usado conforme a proteína a ser purificada como explicado a seguir. As células foram então lisadas em aparelho sonicador MSE Soniprep 150 sendo as células mantidas no gelo durante o processo. O lisado foi submetido a

centrifugação de 30000 g por 15 minutos a 4°C e então o sobrenadante foi recuperado e utilizado para o processo de purificação.

O tampão para ressuspender as células, realizar a sonicação, lavar e equilibrar a coluna cromatográfica foi utilizado de acordo com a proteína a ser purificada. As subunidades da ACC foram submetidas a tampão contendo HEPES pH 7,5 50 mM, KCl 100 mM e glicerol 20%. Já as proteínas PII foram submetidas a tampão contendo Tris-HCl pH 7,5 50 mM, KCl 100 mM e glicerol 20%. E para a eluição das proteínas das respectivas colunas foi adicionado aos tampões imidazol, se purificação em coluna de níquel, ou KCl, se purificação em coluna de heparina ou DEAE, conforme indicado nas figuras de cada purificação no item 5. As proteínas PII de *A. brasilense* foram gentilmente cedidas pela Dr. Luíza M. de Araújo, pós-doutoranda do programa de pós graduação em Ciências-Bioquímica da UFPR e as proteínas PII uridililadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marco Aurelio S. de Oliveira, também pós doutorando do presente programa de pós-graduação

As subunidades da proteína ACC, assim como as proteínas PII utilizadas neste trabalho, foram superexpressas a partir dos plasmídeos listados na tabela 2. As proteínas fusionadas a uma sequência de 6 histidinas (His-BC, His-CT e His-BCCP e His-GlnK) foram purificadas por cromatografia de afinidade em uma coluna Hi-Trap-Chelating-Ni²⁺ (GE Healthcare) pré-carregada com NiCl₂ como descrito pelo fabricante e acoplada a uma bomba peristáltica. A eluição foi feita de forma segmentada com tampões contendo imidazol em concentrações crescentes (SORIANO *et al.*, 2006).

As proteínas sem cauda de histidina foram purificadas em outras colunas que não de níquel, a BCCP e a GlnK foram purificadas em coluna HiTrap Heparina 1 mL (GE Healthcare) e a GlnB foi purificada usando uma coluna DEAE Sefarose FF High Low 1 mL (GE Healthcare). A eluição da GlnB foi realizada com gradiente linear de KCl (0-1M), no AKTA (GE Hhealthcare) já a BCCP e GlnK foram eluidas em gradiente segmentado, com tampões de concentrações crescentes de KCl conforme indicado nas respectivas figuras, no item, 5, em bomba peristáltica.

4.8 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976) com o uso de reagente da SIGMA[®] de acordo com

recomendações do fabricante.

4.9 Eletroforese de proteínas

Eletroforeses de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas em gel de poliacrilamida como descrito por Laemmli *et al.*, (1970). A concentração do gel de corrida utilizada foi de 15% (acrilamida SIGMA®). As eletroforeses foram feitas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad), a uma voltagem constante de 160 V em tampão de corrida 1X (tampão 10X: 3% (p/v) de tris-base, 14% (p/v) de glicina e 1% (p/v) de SDS) pelo tempo necessário de acordo com o tempo de retenção das amostras a serem analisadas.

4.10 Reação de biotinylação

A obtenção de BCCP nativa ou com cauda ₆His em sua forma biotinilada foi procedida de acordo com adaptações dos protocolos de Soriano *et al*, 2006 e Chapman-Smith *et al*, 1994. As proteínas His-BCCP ou BCCP nativa purificadas foram biotiniladas usando um extrato total de *E. coli* (cerca de 35 mg) superexpressando a proteína BirA em células *E. coli* DH10B a partir do plasmídeo pYC216 que é controlado pelo promotor *araC*. A indução de BirA ocorreu por 4 horas após adição de 0,5% (p/v) de arabinose. A reação de biotinylação foi realizada em tampão contendo 10 mM de ATP, 1 mM de biotina, 50 mM de HEPES pH 8, 100 mM de KCl, 5% de glicerol, 1 mM de DTT e 1mM de PMSF, em um tubo de 50 mL contendo as proteínas misturadas (≈3,5 mg de BCCP e ≈35 mg de extrato contendo BirA) para um volume final de reação de 30 mL. A mistura foi incubada por 1h a 37°C e depois durante a noite a 4°C. A proteína BCCP utilizada foi re-purificada como descrito no item 5. A eficácia da reação foi verificada por western blot com estreptavida-HRP.

4.11 Western blot

As proteínas do gel SDS-PAGE foram transferidas para membranas de PVDF (Hybond ECL – GE Healthcare) utilizando um sistema de transferência semi-seco. A membrana foi bloqueada com solução de TBST (TrisHCl pH 7,6; 2,42 g/L; NaCl 8

g/L; tween 20 1 mL/L) e incubada com o estreptavidina-HRP (para identificar proteínas biotinizadas) conforme indicação do fabricante. Após incubação com estreptavidina-HRP a membrana foi submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais foram capturados em sistema de video-imagem UVP.

4.12 Pull Down

Os ensaios de interação entre as proteínas foram realizados usando resina magnética de níquel (His MagTM Agarose-Beads-Promega) ou resina MagSelect SA estreptavidina (SIGMA[®]). As proteínas foram misturadas (em concentração a ser indicada na descrição de cada experimento) e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente com a previamente lavada (com 100 µL de tampão) resina (quantidade de resina por fim otimizada em 5 µL, mas houve variações indicadas na descrição dos experimentos) em 0,5 mL de tampão de interação composto por Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 20 mM, LDAO 0,1% (m/v), glicerol 10% e os metabólitos de acordo com as hipóteses experimentais, indicado nas figuras no item 5. Após a incubação, a resina foi lavada 3 vezes com 0,3 mL de tampão de interação e em seguida incubada por 5 minutos com 20 µL de tampão contendo 500 mM de imidazol. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE corado com Coomassie Blue.

4.13 Atividade da ACC

A atividade *in vitro* da ACC foi monitorada por LC/MS de acordo com Alves *et al.*, 2011. Os componentes da ACC foram misturados para concentração final de 120 nM (considerando monômero cada subunidade) em 0,5 mL de tampão de atividade (HEPES pH 8, NaHCO₃ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 3,5 mM e DTT 1 mM). A reação foi realizada a 25°C e iniciada com a adição de 0,2 mM de acetil-CoA. Amostras de 40 µL foram removidas e misturadas com 10 µL de ácido acético 50% (v/v) para concentração final de 10% (v/v) em tempos conforme indicado em cada experimento no item 5. Malonil-CoA 3-¹³C (SIGMA[®]) foi adicionado para concentração final de 15 µM em cada amostra como controle interno para quantificação. Todas as condições

experimentais foram realizadas em duplicata. As amostras foram centrifugadas a 20000 g por 5 minutos a 4°C e 5 ou 10 µL por corrida foram analisados por LC/MS.

Os metabólitos foram separados usando um UFLC *Prominence* (Shimadzu) em uma coluna C18 2,6 µm 50 x 2,1 mm (Phenomenex) mantida a 40°C. A fase móvel foi composta por 15 mM de ácido acético e 10 mM de tributilamina (solvente A) ou metanol (solvente B). As amostras foram colocadas em *vials* e mantidas a 4°C em um aplicador automático de amostras que injetou 10 µL de amostra para corrida de 0.2 mL/minutos em duplicata. Os metabólitos foram eluidos da coluna usando um gradiente linear de solvente B (0-100%) em 20 minutos. A coluna foi pré-equilibrada com solvente A por 10 minutos.

A detecção dos metabólitos foi feita por acoplamento ao LC com um MicroQTOF-QII (Bruker Daltonics), equipado com uma fonte de ionização *electrospray* em modo negativo. Íons carregados negativamente foram detectados dentro de uma faixa de m/z de 50 a 1000 a cada segundo. A voltagem de capilaridade foi mantida a -3500V, a pressão da bomba de nitrogênio foi mantida em 2,0 bar e o gás de secagem em 6 litros por minuto, a 180°C. Sempre antes da análise dos metabólitos no LC/MS o equipamento foi calibrado com padrões de massa. Soluções padrão de ADP, acetil-CoA e malonil-CoA (SIGMA®) foram preparados na hora do uso e misturados para concentrações finais de 5, 10, 25, 35, 50, 75 e 100 µM para cada metabólito, assim, foi possível verificar o tempo de retenção e gerar uma curva padrão de cada composto. A curva padrão foi gerada usando uma regressão linear e obteve-se um $R > 0,99$ para todos os compostos.

5 RESULTADOS

5.1 Purificação das subunidades da ACC e das proteínas PII

Para sustentar a hipótese de que a interação entre PII e BCCP seja um evento conservado em bactéria, uma vez que já foi identificado em planta (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010), foram purificadas as proteínas PII e ACC de *E. coli*, assim, foi possível realizar ensaios *in vitro* para verificar a possível interação entre PII e BCCP.

Para este trabalho, os plasmídeos capazes de superexpressar as proteínas GlnK, His-BCCP, His-BC, His-CT e BirA foram gentilmente disponibilizados por Dr. Mike Merrick (GlnK), Dr. Aileen Soriano (His-BCCP, His-BC e His-CT) e Dra. Anne Chapman-Smith (BirA) conforme indicado na tabela 1. No entanto, para possibilitar ensaios de interação cobrindo uma maior gama de condições experimentais, foram feitas novas clonagens para obtenção de plasmídeos capazes de superexpressar, por hora, His-GlnK, GlnB e BCCP. Com estes plasmídeos foi possível explorar

As proteínas purificadas foram, aqui neste trabalho, consideradas adequadas para os ensaios propostos (ensaios de *pull down* e de atividade) quando apresentaram poucas bandas de proteínas contaminantes em análise por SDS-PAGE.

A proteínas His-BC, His-CT e His-BCCP foram purificadas em apenas uma etapa cromatográfica com sucesso, obtendo-se frações condizentes com o propósito de uso (FIGURA 13), eluidas em maior parte em 300 mM de imidazol. Na figura 13A, é possível verificar que a proteína His-BC é altamente expressa em relação as demais subunidades da ACC. Toda ela encontrou-se solúvel e foi eluída com 300 mM de imidazol. Após mistura das frações mais puras e diálise em tampão HEPES pH8, KCl 100 mM e 20% de glicerol.

A proteína His-CT é uma proteína heterodimérica constituída pelas subunidades α e β . A subunidade α possui 35,1 kDa e a subunidade β possui 33,2 kDa. Elas são co-expressas por serem codificadas em um mesmo operon no plasmídeo que havia disponível, sendo que a subunidade α possui cauda de histidina na porção N-terminal. A subunidade β acaba sendo co-purificada devido ao caráter estável da interação entre as subunidades α e β . A figura 12B mostra que as subunidades de CT co-purificadas de maneira satisfatória, assim como a His-BCCP

na figura 13C.

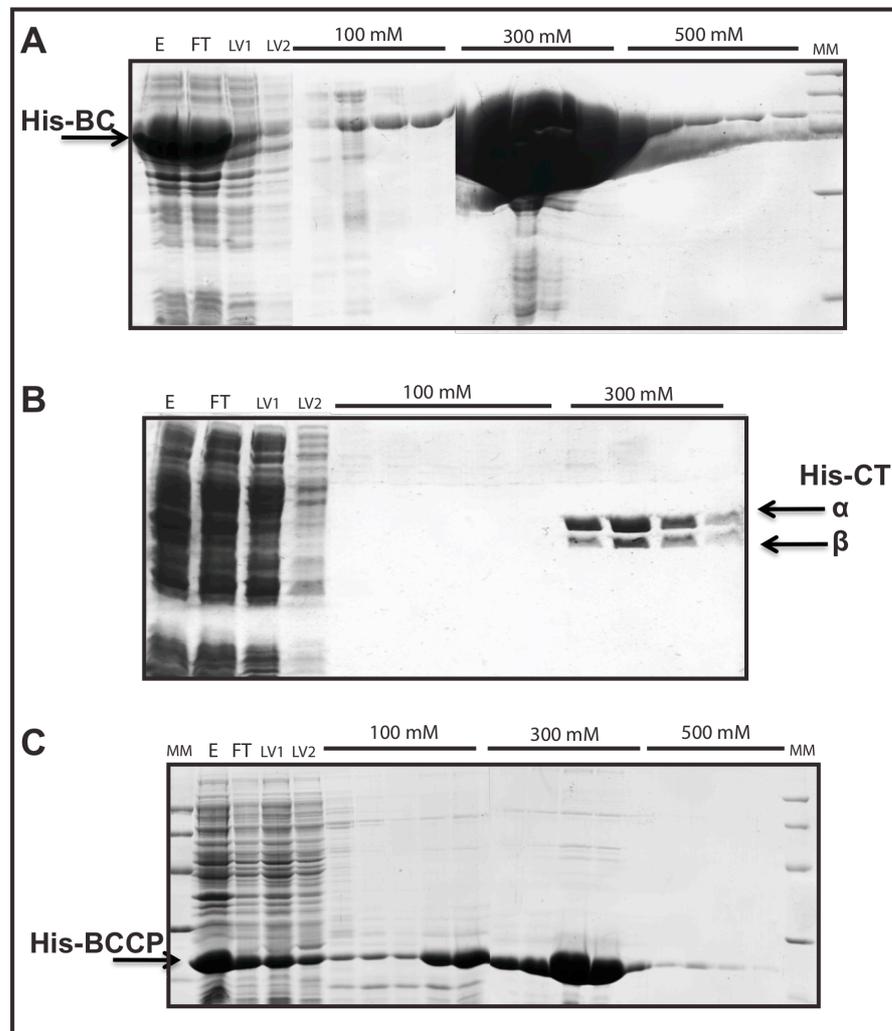


FIGURA 13 – Purificação das subunidades da ACC de *E. coli*

(A) Purificação da His-BC; **(B)** Purificação de His-CT α e β ; **(C)** Purificação da His-BCCP; E- Extrato de proteínas totais; FT (*Flow through*) extrato de proteínas não ligadas na coluna de níquel; LV1- Lavagem com 10 mM de imidazol; LV2- Lavagem com 50 mM de imidazol; MM- Marcador de massa (kDa – 97, 66, 45, 30, 20.1, 14.4 de cima para baixo); SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

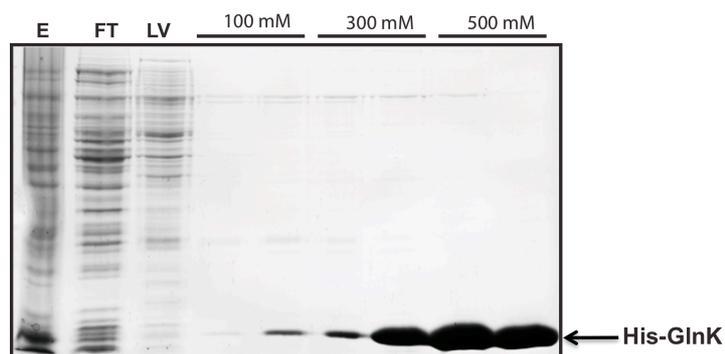


FIGURA 14 – Purificação de His-GlnK de *E. coli*

E- Extrato de proteínas totais; FT (*Flow through*) extrato de proteínas não ligadas na coluna de níquel; LV- Lavagem com 10 e 50 mM de imidazol (5 mL cada concentração); SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

Na figura 14, se tem o gel SDS-PAGE com o perfil de purificação da His-GlnK, obtida a partir do plasmídeo pTRPETHisGlnK mostrando-se adequada para os ensaios realizados neste trabalho e eluidas principalmente em 500 mM de imidazol.

As proteínas sem cauda de histidina (BCCP, GlnK e GlnB) purificadas neste trabalho foram submetidas, em uma primeira tentativa de purificação, a uma coluna de heparina. A BCCP e a GlnK foram purificadas com sucesso nessa coluna (FIGURAS 15A e 15B, respectivamente). O plasmídeo pTRPETBCCPn permitiu a superexpressão de BCCP em sua forma nativa e foi purificada em uma única etapa cromatográfica.

Para a purificação da GlnB nativa, inicialmente utilizou-se um plasmídeo já disponível no laboratório, o pDK601 (Van Heeswijk *et al.*, 1993), o qual expressa GlnB nativa de *E. coli*. Esse plasmídeo é controlado pelo promotor de *lacZ* em vetor pUC18. Após expressão de *glnB* induzida por 0,5 mM de IPTG durante à noite a 30°C sob agitação (protocolo testado de maior expressão), foi confeccionado o extrato proteico e este foi submetido primeiramente à coluna de heparina. No entanto, observou-se que GlnB foi capaz de se ligar a heparina de maneira parcial e foi diluída em várias frações de eluição (dados não mostrados). Perante o insucesso da coluna de heparina, testou-se coluna de fenil sefarose. O extrato proteico com GlnB superexpressa foi aquecido a 75°C por 15 minutos (MOURE *et al.*, 2012), submetido ao gelo por 30 minutos e centrifugado a 30000 g por 15 minutos. Depois disso o sobrenadante foi submetido à precipitação com 60% (p/v) de sulfato de

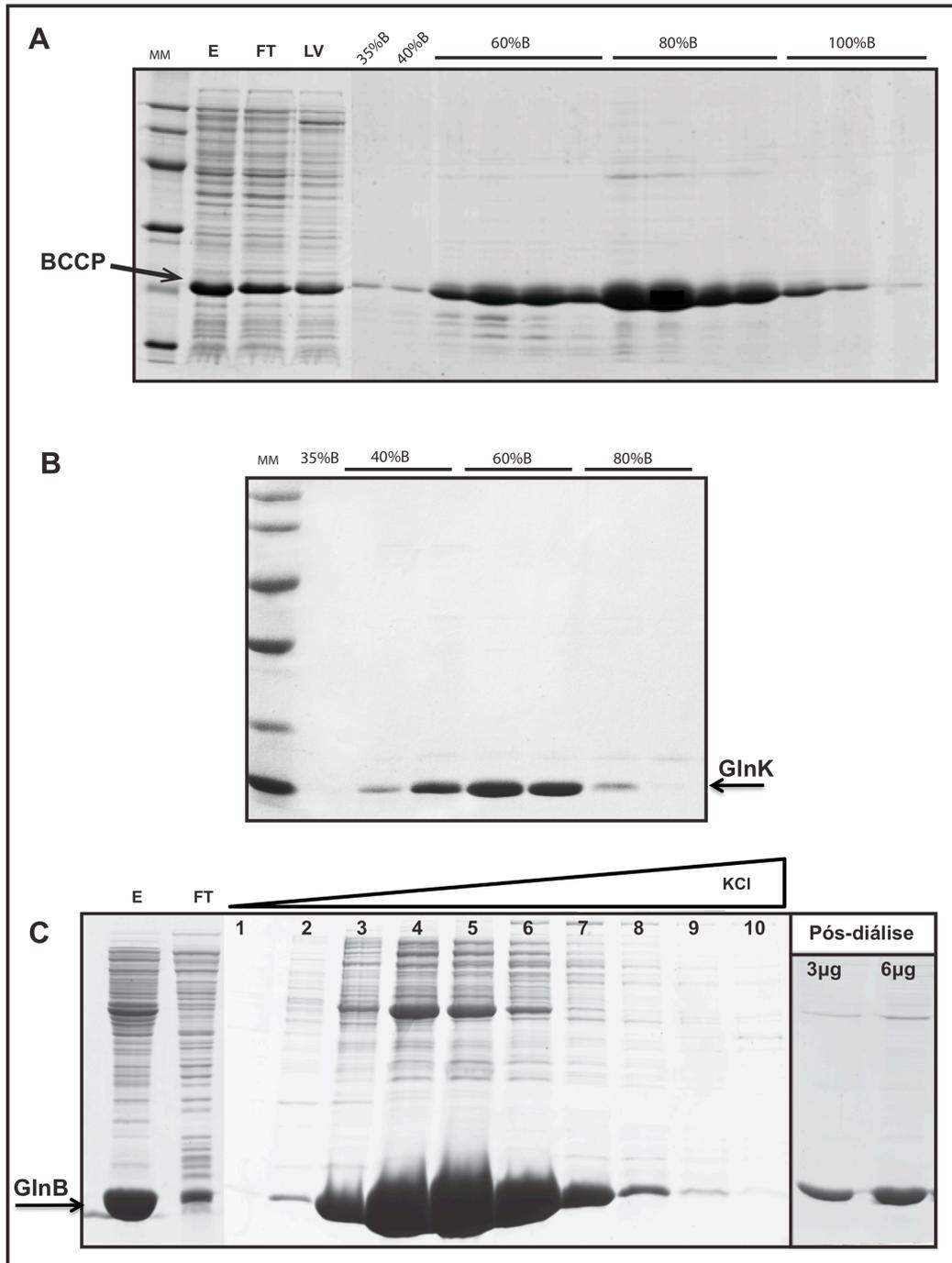


FIGURA 15 – Purificação de BCCP, GlnK e GlnB de *E. coli*

(A) Purificação de BCCP, em que a eluição foi feita em gradiente segmentado, conforme indicado na figura (porcentagem de tampão B em tampão A); (B) Purificação de GlnK, em que a eluição foi feita em gradiente segmentado, conforme indicado na figura (porcentagem de tampão B em tampão A); (C) Purificação de GlnB, em que a eluição se fez em gradiente linear de KCl, na linha 1 se tem 20% de tampão B até 100% na linha 10 (Purificação no AKTA (GE Healthcare)). As frações das linhas 4, 5 e 6 foram misturadas, dialisadas e analisadas em SDS-PAGE como indicado acima no tópico “Pós-diálise”;

E- Extrato de proteínas totais; FT (*Flow through*) extrato de proteínas não ligadas na coluna; LV- Lavagem com 10 e 20% de tampão B (50 mM de TrisHCl pH7,5 (HEPES pH8 para BCCP), 1 M de KCl e 20% glicerol) em tampão A (igual ao tampão B porém sem KCl); MM- Marcador de massa (kDa – 97, 66, 45, 30, 20.1, 14.4 de cima para baixo) SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

amônio por 40 minutos no gelo. Após recuperação do sobrenadante depois da centrifugação a 30000 g por 15 minutos, o extrato proteico foi então submetido à cromatografia em coluna fenil sefarose equilibrada em tampão contendo TrisHCl pH 7,5 e 20 mM de sulfato de amônio. Em sistema AKTA (GE Healthcare), a eluição foi realizada com gradiente linear de 1M até zero de sulfato de amônio em 20 mL (1 mL/min). Assim, foi possível verificar que a GlnB encontrou-se toda na fração solúvel aplicada à coluna e toda ligada à resina, no entanto, GlnB foi eluída de forma diluída ao longo do gradiente e com quantidade de contaminantes impróprias para os ensaios pretendidos. Sendo assim, se fez necessária a construção de um plasmídeo capaz de expressar GlnB nativa em um vetor que possivelmente expressasse GlnB em maior concentração em relação as proteínas totais, para assim, possivelmente facilitar a purificação. Então GlnB foi clonada no vetor pET29a. Essa clonagem originou o plasmídeo pTRPETGlnB que de fato aumentou o nível de expressão de GlnB e possibilitou a purificação de GlnB em única etapa usando uma coluna DEAE sefarose, conforme descrito no item 4.7. Após a diálise, a GlnB purificada foi dosada e analisada em SDS-PAGE (FIGURA 15C), revelando que ainda havia contaminantes presentes de mais alta massa, com menor intensidade de banda que as bandas de da proteína GlnB. Para a eliminação desses contaminantes poderá ser feita futuramente uma cromatografia de gel filtração.

5.2 Biotinilação de BCCP

A proteína BCCP é a única proteína biotinilada em *E. coli* e a atividade da ACC é dependente da biotinilação da BCCP. A biotina é ligada covalentemente ao resíduo da lisina 122 da BCCP em uma reação catalisada pela enzima BirA (CRONAN JR e WALDROP, 2002). Essa reação pode ser reproduzida *in vitro*, neste trabalho, as proteínas BirA e BCCP foram misturadas na presença de tampão contendo ATP e biotina resultando em uma BCCP biotinilada e ativa, de acordo com protocolo modificado baseado nos sugeridos por Soriano *et al.*, 2006 e Chapman-Smith *et al.*, 1994.

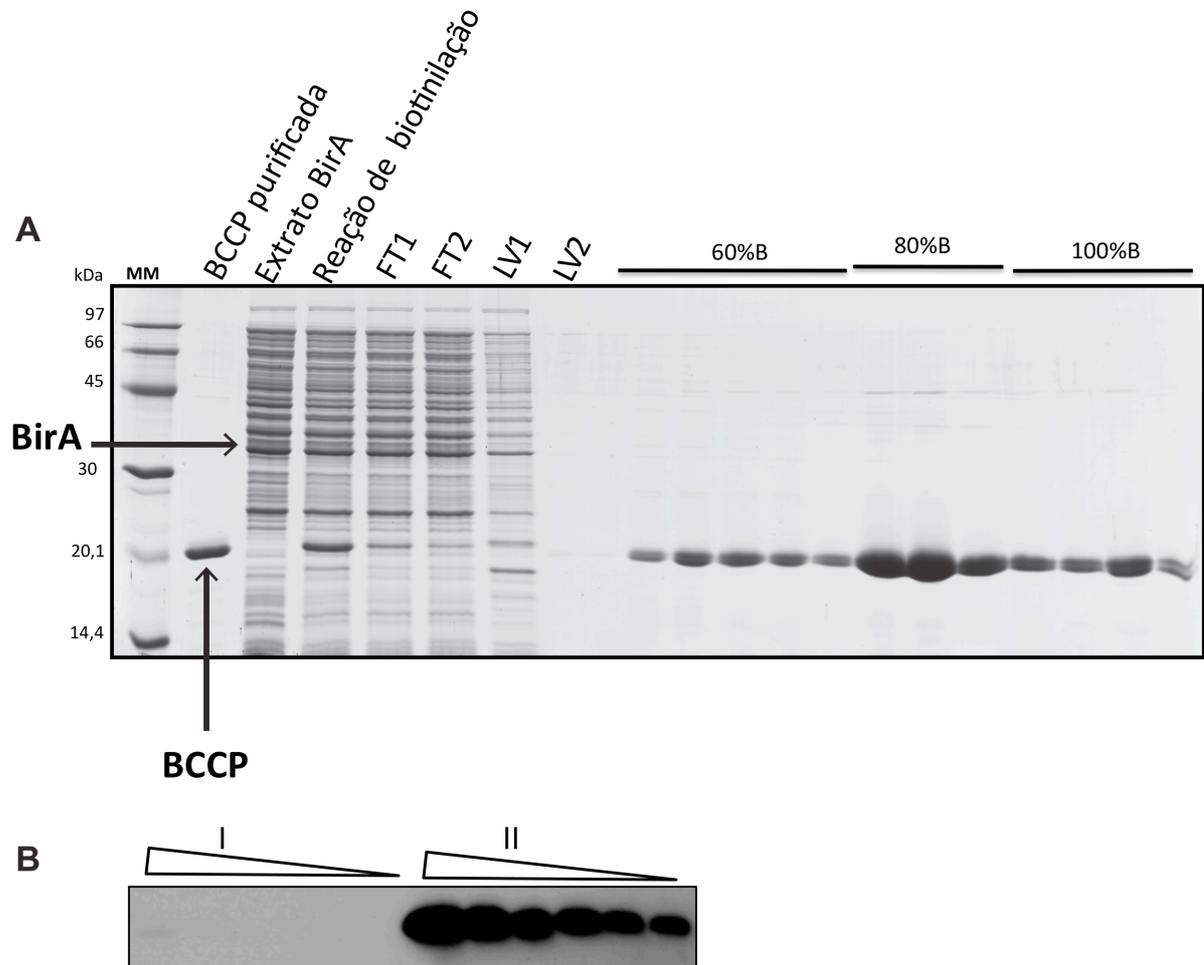


FIGURA 16 – Biotinylação de BCCP de *E. coli*

(A) Purificação de BCCP biotinylada. SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue. MM- Marcador de massa (kDa – 97, 66, 45, 30, 20.1 , 14.4). E- Extrato de proteínas totais; FT1- (*Flow through*) extrato de proteínas não ligadas na coluna de heparina; FT2- FT1 submetido a coluna e coletado após; LV1 e LV2- Lavagem com 10 e 20%, respectivamente, de tampão B (50 mM de TrisHCl pH7,5, 1 M de KCl e 20% glicerol) em tampão A (igual ao tampão B porém 150 mM KCl). (B) Western blot contra estreptavidina-HRP (1:5000). Diluição seriada de BCCP (1 até 0,03 µg) antes (I) e depois (II) da reação de biotinylação.

A BCCP nativa apresentou bastante afinidade pela resina de heparina, uma vez que foi possível observar que ainda em 1M de KCl há BCCP eluída na resina de heparina (FIGURA 15A). Isso favoreceu a re-purificação de BCCP após a biotinylação uma vez que a proteína BirA não mostrou afinidade pela heparina (FIGURA 16A). Como mostrado na figura 16A, aparentemente após submeter o FT à

coluna de heparina pela segunda vez, obteve-se mais BCCP ligada à coluna, uma vez que se pode ver diminuição da intensidade na banda referente à BCCP do FT1 (extrato de proteínas submetida à coluna mas não ligadas) para o FT2 (proteínas não ligadas na coluna provenientes de FT1 re-aplicada à coluna). Desta forma, foi possível obter uma BCCP biotinilada e bastante pura, com concentração pós-diálise de 0,4 mg/mL de proteína. A avidina é uma proteína que possui forte e específica afinidade à biotina, essa é a interação não covalente mais forte encontrada na natureza entre um ligante e uma proteína (FALL *et al.*, 1971). Essa característica, permitiu que, por meio de uma estreptavidina-HRP comercial (GE-Healthcare), fosse verificada a eficiência da biotilação de BCCP por western blot (FIGURA 16B).

5.3 Interação GlnK-BCCP

Após obtenção da BCCP na sua forma nativa biotinilada (holoBCCP) foi possível testar a hipótese de que a interação entre PII e BCCP seria um fenômeno conservado na natureza ocorrendo desde bactérias até organismos mais recentes, como as plantas, onde esta interação foi identificada pela primeira vez.

Ensaio de *pull down* foram realizados baseados nas condições de interação encontradas em *A. thaliana*, em que o complexo PII-BCCP foi detectado na presença de MgATP e desfavorecido na presença de 2-OG. Seguindo essas condições, uma vez que se teve em mãos as proteínas BCCP (em sua forma nativa e biotinilada) e a His-GlnK purificadas, foi possível testar a interação entre essas proteínas *in vitro*, como descrito a seguir no ensaio da figura 17.

Na figura 17, se tem um ensaio de *pull down* usando as proteínas purificadas, His-GlnK, holoBCCP e His-BC na presença de efetores conforme indicado na figura. Na linha 1 da figura 17A, a His-GlnK foi submetida sozinha à resina de níquel, e após lavagens e adição de imidazol 500 mM a His-GlnK foi eluída sozinha, sem contaminantes, mostrando que His-GlnK possui afinidade específica à resina através de sua cauda de histidina N-terminal. Na linha 2 desta mesma figura, se tem a holoBCCP nativa submetida à resina, e como se pode verificar, após as lavagens a resina não foi capaz de reter holoBCCP significativamente. O que mostra que holoBCCP não possui afinidade à resina de níquel. Por sua vez, na linha 3, é apresentada a amostra de His-BC submetida à resina, e como esperado, foi eficientemente retida por meio de sua cauda de histidina. Sendo assim,

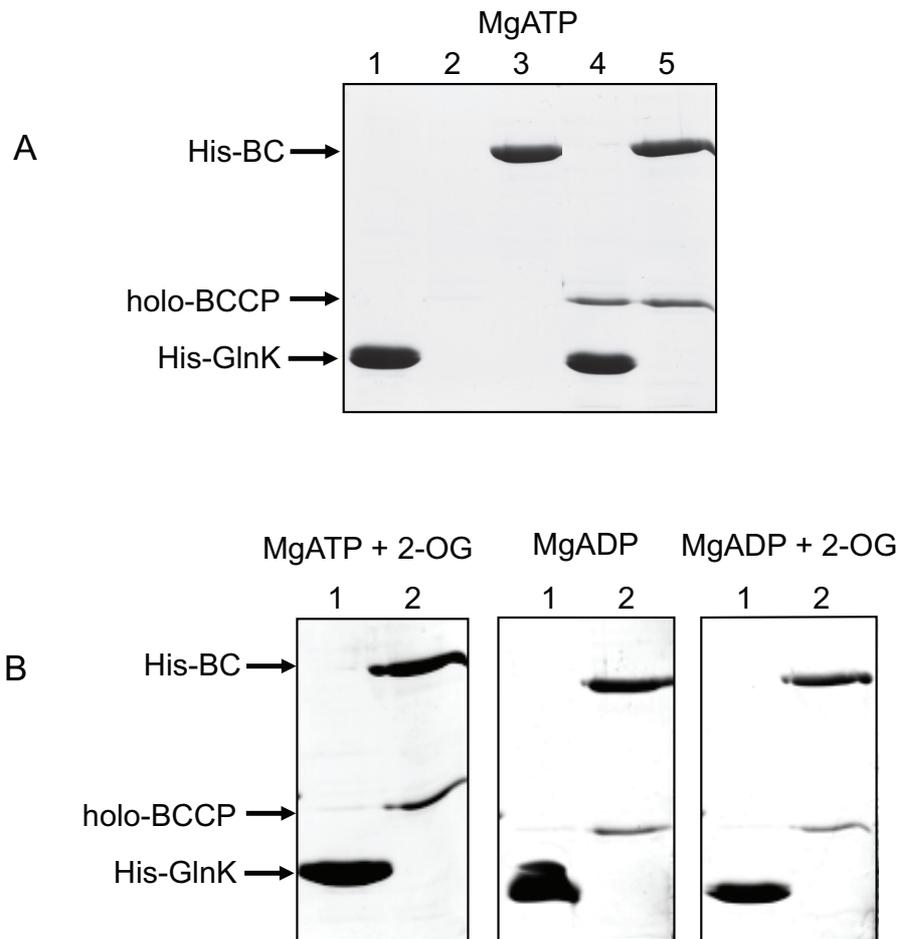


FIGURA 17 – Interação entre GlnK e holoBCCP de *E. coli*

(A) Interação His-GlnK-BCCP na presença de MgATP. 1- Somente His-GlnK na resina; 2- Somente holoBCCP na resina; 3- Somente His-BC na resina; 4- His-GlnK mais holoBCCP; 5- His BC mais holoBCCP; **(B)** Interação His-GlnK-holoBCCP na presença de MgATP mais 2-OG, MgADP e MgADP mais 2-OG; 1- His-GlnK mais BCCP; 2- His-BC mais BCCP; Ensaio de *pull down*, usando 15 μ L de resina de níquel, 30 μ g de BCCP, 15 μ g de His-BC e de His-GlnK; SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

misturando holoBCCP com His-GlnK (linha 4) e com His-BC (linha 5), foi possível verificar que a holoBCCP foi especificamente co-precipitada com tais proteínas. A interação de BCCP com BC já é conhecida e é bastante estável (CHOI-RHEE e CRONAN, 2003) e foi usada como controle positivo. A interação entre PII e His-BC foi testada e não observada em ensaios de *pull down* (dados não mostrados). Na linha 4 da figura 17A, foi pela primeira vez mostrada a interação *in vitro* de holoBCCP com GlnK. Na figura 17B foi testada tal interação na presença de MgATP mais 2-OG, MgADP e MgADP mais 2-OG e nessas três condições de tampão não

foi verificada interação. Isso mostrou que o 2-OG exerce efeito negativo na interação GlnK-BCCP uma vez que mesmo na presença de MgATP, o favorecedor da interação, não permitiu a verificação do complexo GlnK-holoBCCP. Além disso, o ADP não foi capaz de favorecer a interação de His-GlnK com holoBCCP, nem na ausência ou presença de 2-OG (FIGURA 17B). No controle positivo, em que se tem a His-BC usada para capturar BCCP, a composição dos tampões se mostrou indiferente, uma vez que sob todas as condições BCCP foi co-precipitada especificamente com His-BC. Além do mais, a interação entre His-GlnK e holoBCCP não foi observada na ausência de efetores, e ainda, não foi afetada pela presença saturante de biotina livre (dados não mostrados), o que mostra o caráter de especificidade da interação, modulada por MgATP e por BCCP biotinilada, e não apenas por biotina. A necessidade de biotina ligada a BCCP para interação foi confirmada pelo fato de que apenas a holo-BCCP mas não a apo-BCCP ter sido co-purificada com His-GlnK na presença de MgATP (FIGURA 18).

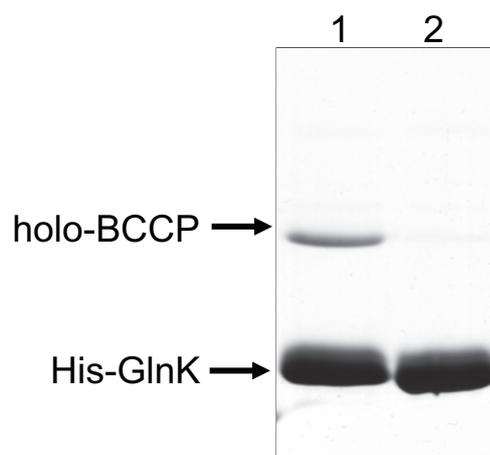


FIGURA 18 – Interação entre GlnK e BCCP de *E. coli* requer biotinilação de BCCP

1- His-GlnK mais holoBCCP; 2- His-GlnK mais apoBCCP; Ensaio de *pull down*, usando 15 μ L de resina de níquel, 30 μ g de BCCP, 15 μ g His-GlnK; SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

Foi testada *in vitro* a interação entre His-BCCP (biotinilada) e GlnK em ensaio de *pull down*. Neste ensaio a His-holoBCCP foi retida pela cauda de histidina C-terminal na resina magnética de níquel (His MagTM Agarose-Beads-Promega) com o intuito de capturar GlnK se ocorresse específica interação, no entanto, não foi possível detectar interação (dados não mostrados). Isso deu a idéia de que a cauda de histidina no domínio C-terminal de BCCP estivesse, de alguma forma, impedindo a interação entre as proteínas. Um outro ensaio realizado fortaleceu a idéia de que a

região C-terminal da BCCP é importante para a interação PII-BCCP. Nesse experimento de *pull down* foi usado uma resina magnética de avidina. A avidina é uma proteína que possui forte afinidade à biotina, e desta forma, a BCCP biotinilada foi retida na resina especificamente pela porção C-terminal (região com a biotina ligada). No entanto, não foi possível pescar PII desta maneira (dados não mostrados). Acredita-se que não foi possível detectar a formação do complexo His-holoBCCP-GlnK devido a porção de ligação de GlnK à BCCP estar ocultada pela ligação desta região (domínio C-terminal) à resina.

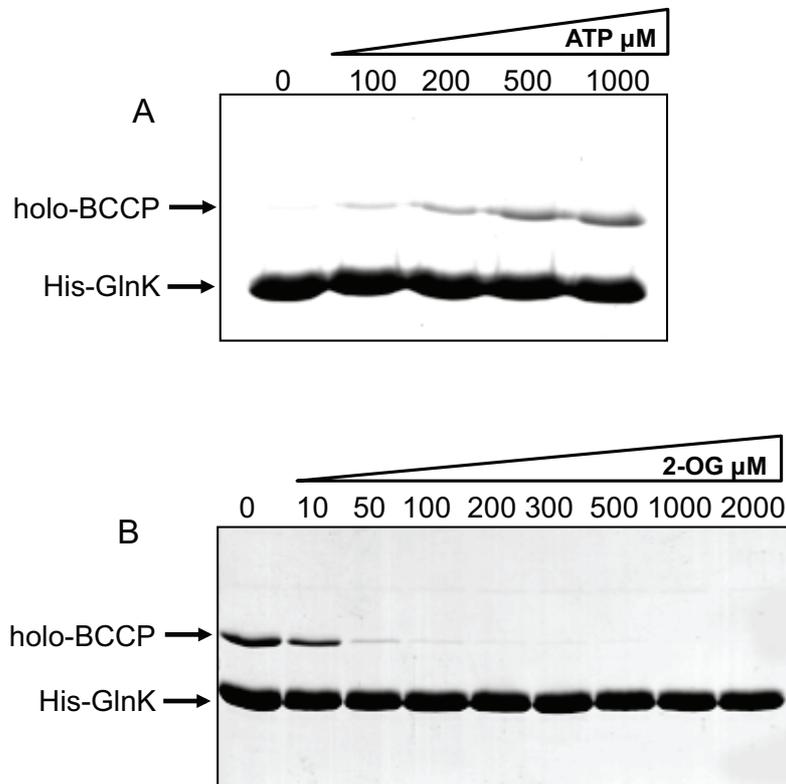


FIGURA 19 – Efeito da concentração de ATP e 2-OG sob o complexo GlnK-holoBCCP de *E. coli*

(A) Concentração crescente de ATP, da esquerda para a direita como indicado; **(B)** Concentração crescente de 2-OG, da esquerda para a direita como indicado, na presença de 3,5 mM MgATP. Ensaio de *pull down*, usando 5 μL de resina de níquel, 15 μg de holoBCCP, 10 μg His-GlnK; SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

A interação entre His-GlnK e holoBCCP mostrou ser dependente de ATP. Para determinar qual concentração de ATP é crítica para estimular essa interação foi realizado um ensaio em concentração crescente de ATP, de zero a 1 mM. Em concentrações de ATP iguais ou superiores a 0,5 mM a interação entre GlnK e holoBCCP ocorreu em um nível próximo do ótimo, aparentemente, devido às próximas intensidades de banda de holoBCCP em 0,5 e 1 mM de MgATP (FIGURA 19A).

A figura 19B mostra o efeito da concentração de 2-OG na interação entre His-GlnK e holoBCCP na presença de ATP saturante (3,5 mM). Nesse ensaio é possível notar a sensibilidade da interação His-GlnK-BCCP frente ao 2-OG, mesmo a menor concentração de 2-OG utilizada (10 μ M) já foi suficiente para afetar a interação. Na presença de 2-OG 1 mM a interação GlnK-BCCP já não foi mais detectada. Variando a razão ATP/ADP e variando a concentração de 2-OG dentro da faixa fisiológica (JIANG e NINFA, 2007), notou-se que a interação His-GlnK-BCCP foi alterada. O resultado deste experimento confirma os dados mostrados anteriormente onde menores razões ATP/ADP e maiores concentrações de 2-OG desfavorecem a formação do complexo (FIGURA 20).

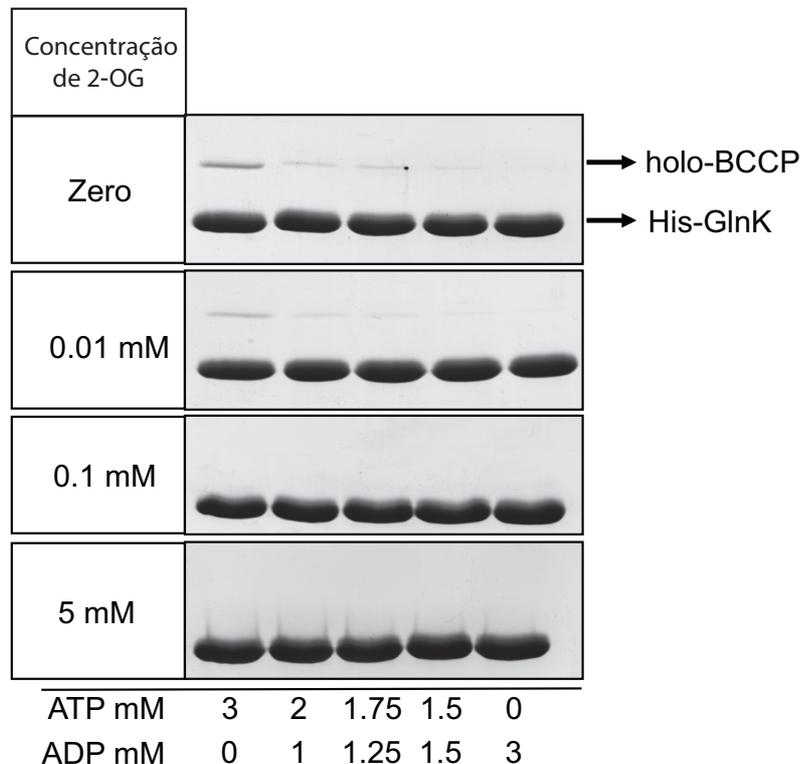


FIGURA 20 – Efeito da razão ATP/ADP e 2-OG sob o complexo GlnK-holoBCCP de *E. coli*
Ensaio de *pull down*, usando 5 μ L de resina de níquel, 15 μ g de holoBCCP, 10 μ g His-GlnK; SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

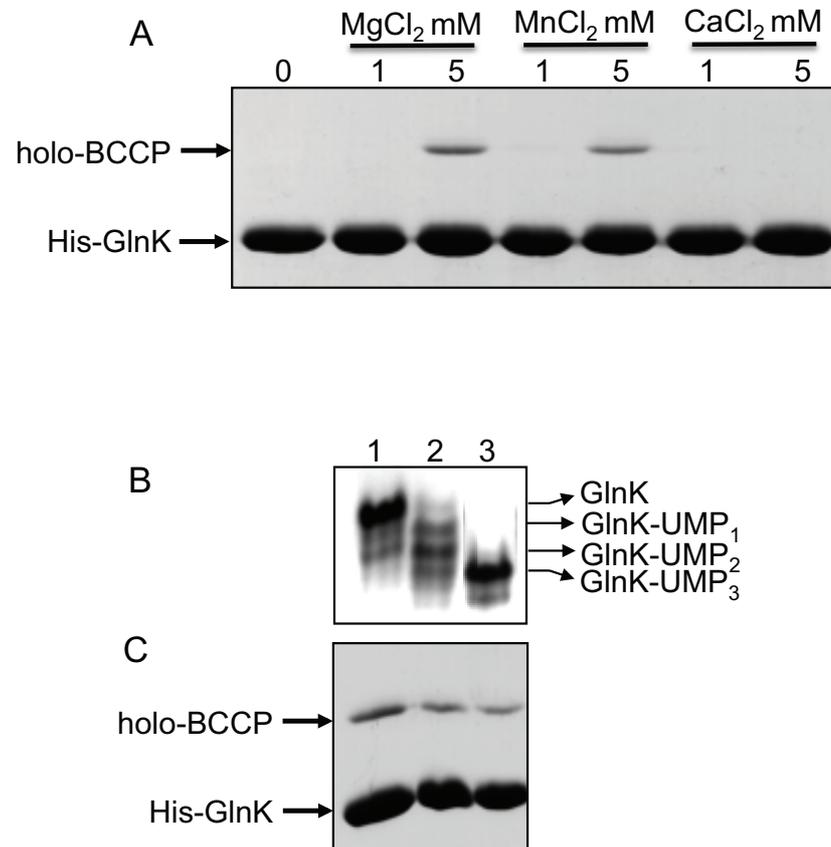


FIGURE 21 – Efeito de metais divalentes e da uridililação de GlnK na interação GlnK-BCCP em *E. coli*

(A) Formação de complexo entre His-GlnK e holoBCCP na presença de ATP 3,5 mM na presença ou ausência de metal divalente como indicado. A primeira linha é um controle sem metal. (B) His-GlnK uridilada *in vitro* e submetida a Native-PAGE corado com Coomassie Blue. 1- Não modificada; 2- parcialmente uridilada; 3- totalmente uridilada. (C) As mesmas preparações de His-GlnK da figura (B) submetidas a ensaio de *pull down* para co-precipitar holoBCCP na presença de MgATP 3,5 mM, usando 5 µL de resina, 15 µg de holoBCCP, 10 µg His-GlnK; SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

Para que a interação entre His-GlnK e holoBCCP ocorra, foi necessário, além de ATP, a presença dose dependente de um metal divalente como Mg²⁺ ou Mn²⁺. O Ca²⁺ não foi capaz de estimular a formação do complexo como mostra a figura 21A. Na ausência de metal ou com 1 mM não se observou interação, somente com 5 mM dos metais Mg²⁺ e Mn²⁺ verificou-se interação, já com Ca²⁺ não houve interação. Esse resultado sugere que o MgATP é o efetor relevante fisiologicamente ao invés de ATP, como hipotetizado por DA ROCHA *et al.* (2013).

As proteínas PII podem sofrer modificação covalente por meio da adição de um grupo uridilil por monômero de PII. Essa modificação provavelmente implica em mudança de conformação da PII e na acessibilidade à volta-T de proteínas-alvo, (JIANG *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2010; BONNATO *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008). No entanto, essa modificação não foi determinante para impedir a interação entre GlnK e holoBCCP (FIGURA 21C). Contudo, a figura 21C ainda mostra que a interação GlnK-holoBCCP foi, de certa forma, afetada pela modificação covalente em GlnK. Tanto a forma parcial quanto a totalmente uridililada de GlnK foi capaz de reter menor quantidade de holoBCCP no ensaio de *pull down* quando comparadas com a GlnK não uridililada.

5.4 Atividade da ACC na presença de GlnK

A enzima acetil-CoA carboxilase, que catalisa a formação dos produtos de reação ADP, Pi e malonil-CoA a partir dos substratos ATP, HCO_3^- e acetil-CoA, foi descrita como tendo sua atividade parcialmente inibida por PII de maneira dose dependente em *A. thaliana*. Uma concentração de PII de 1 μM já foi suficiente para inibir em 50% a atividade da ACC em extrato de cloroplasto de *A. thaliana*, este foi o máximo de inibição observado em ensaio utilizando ^{14}C NaHCO_3 como substrato. (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010).

Foi mostrado que a PII de *A. thaliana* não alterou o K_m do acetil-CoA. Sendo assim, PII foi sugerida como sendo um inibidor não competitivo, ou melhor dizendo, uma subunidade reguladora dissociável da ACC, uma vez que não altera o K_m do acetil-CoA mas diminui a velocidade máxima da reação. O 2-OG foi capaz de reverter tal inibição de maneira dose dependente. Com 1 mM de 2-OG a ACC teve sua atividade restaurada na presença de 0,36 μM de PII e 5 mM de MgATP (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010).

Neste trabalho, foi analisada a atividade da ACC em LC-MS, verificando, primeiramente, se a enzima estava ativa, como mostrado na figura 22, em que está representado o aumento na concentração dos produtos ADP e malonil-CoA de acordo com o aumento do tempo de reação. A quantificação dos principais produtos de reação ADP e malonil-CoA indica uma estequiometria de aproximadamente 1:1 (FIGURA 22B) confirmando resultados anteriores (ALVES *et al.*, 2011, SORIANO *et al.*, 2006).

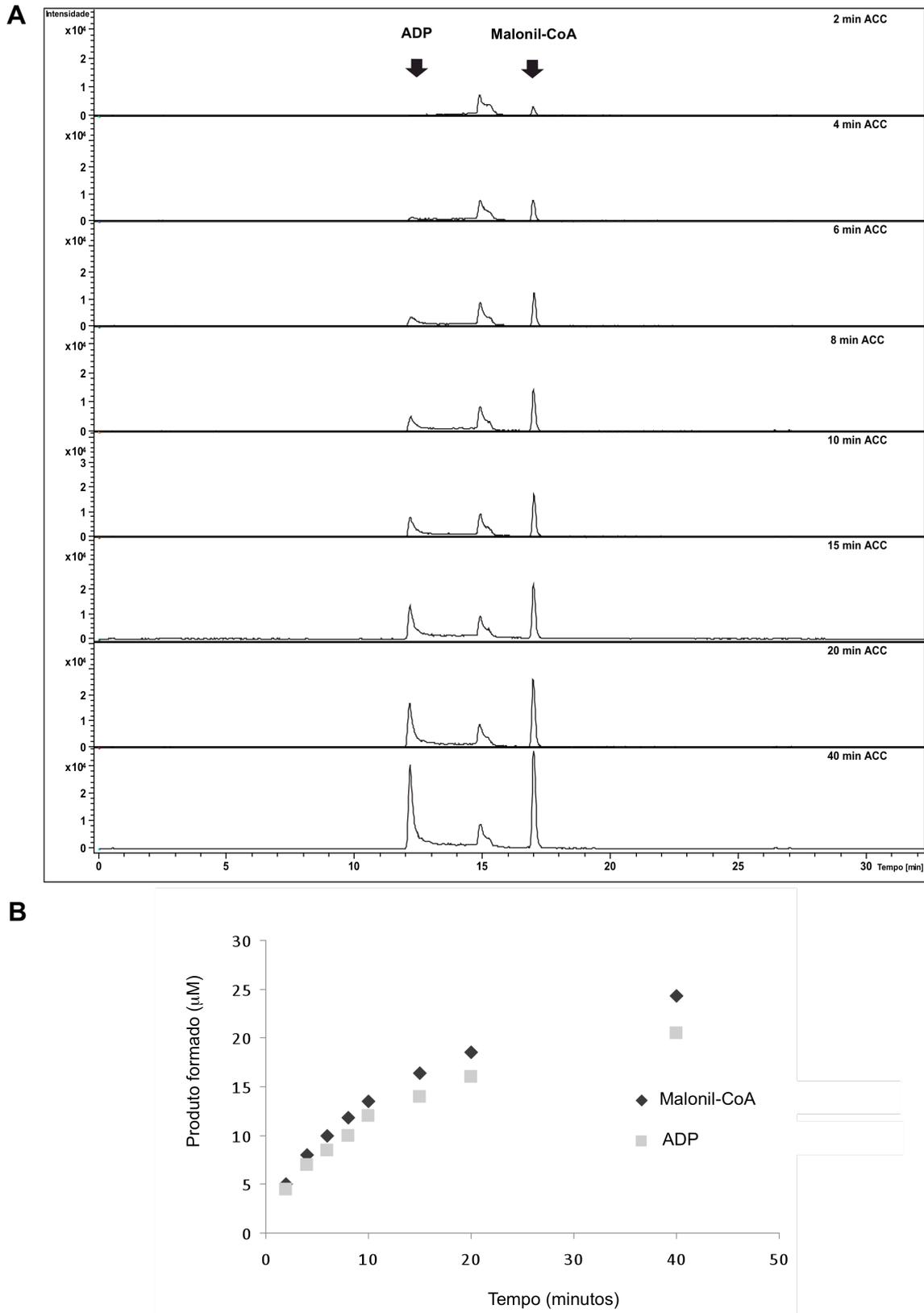


FIGURA 22 – Atividade *in vitro* da acetil-CoA carboxilase de *E. coli*

Reação foi parada nos tempos indicados e os produtos ADP e malonil-CoA foram analisados e quantificados por LC-MS. **(A)** Cromatograma dos picos indicados pelas flechas de ADP e malonil-CoA. O pico no tempo de retenção de 15 é o sinal de ADP gerado pela fragmentação do ATP na fonte de ionização. Como controles foram realizadas reações sem acetil-CoA, sem holoBCCP e sem ACC (não mostrados). **(B)** Gráfico gerado pela quantificação dos picos da figura (A). Um padrão interno de ^{13}C malonil-CoA e uma curva de ADP foi utilizada para quantificação. A formação dos produtos foi linear em até 10 minutos de incubação.

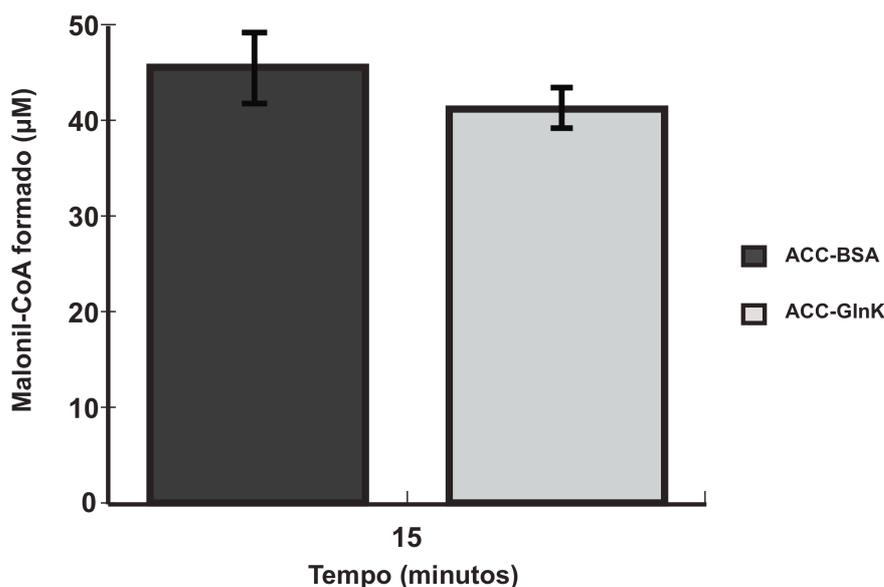


FIGURA 23 – Efeito de GlnK na atividade *in vitro* da acetil-CoA carboxilase de *E. coli*

Formação de malonil-CoA pela ACC foi medido na presença de GlnK 10 µM e de BSA (em mesma quantidade de proteína como controle) foram comparadas no tempo de 15 minutos de reação. A reação foi parada com 10% (v/v) de ácido acético. A reação foi analisada e o malonil-CoA quantificado por LC-MS, com injeção de 10 µL de amostra. O ¹³C malonil-CoA foi usado como controle interno para quantificação.

Para avaliar se PII de *E. coli* é capaz de interferir na atividade da ACC, realizou-se ensaios em que a formação de malonil-CoA por ACC foi analisada em LC-MS. ACC foi incubada com BSA, como controle, e com GlnK, sob as mesmas condições do experimento que mostra a atividade da ACC sozinha na figura 22, porém com o dobro de amostra injetada no LC-MS (10 µL). Foi verificado, assim, que a GlnK não exerce efeito na atividade da ACC (FIGURA 23), mesmo variando a razão molar de GlnK:ACC (de 0,1 até 100x), aplicando as proteínas no sistema de reação em diferentes ordens, variando tempo de incubação e composição do tampão, sempre com MgATP saturante, não foi possível obter significativa diferença na atividade da ACC perante GlnK. A GlnK-UMP também não mostrou efeito na atividade da ACC (dados não mostrados).

Para verificar se a ausência de efeito na atividade da ACC na presença de GlnK ocorreu por GlnK não interagir com BCCP no tampão utilizado para o ensaio de atividade, foi realizado um ensaio de *pull down* em que se utilizou o tampão de atividade, composto por HEPES pH 8, NaHCO₃ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 3,5 mM, DTT 1 mM e acetil-CoA 0,2 mM. Para verificar se sob essas condições ocorre interação PII-BCCP. Como mostrado na figura 24, a holoBCCP foi co-precipitada com sucesso por His-GlnK (FIGURA 24).

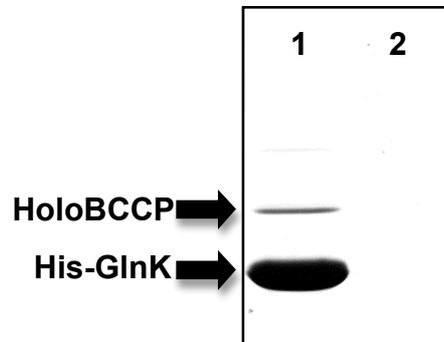


FIGURA 24 – Interação GlnK-holoBCCP em tampão de atividade da ACC

Ensaio de *pull down* usando o tampão de atividade (HEPES pH 8, NaHCO₃ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 3,5 mM, DTT 1 mM e acetil-CoA 0,1 mM). 1- His-GlnK mais holoBCCP; 2- Somente holoBCCP na resina de níquel.

5.5 Complexo ternário BC-BCCP-P II

Em *E. coli* foram encontradas duas proteínas tipo PII, a GlnK e a GlnB. Foi descrito até então neste trabalho a interação entre GlnK e holoBCCP e a análise da atividade de ACC sob influência de GlnK, no entanto, ainda não foi mostrado dados sobre interação de BCCP com GlnB de *E. coli* nem dados de atividade da ACC sob influência de GlnB. Uma vez que, até ainda não foi obtido um plasmídeo capaz de superexpressar GlnB com cauda de histidina, não houve a possibilidade de submeter holoBCCP em sua forma nativa ao ensaio de *pull down* usando GlnB como isca, assim como foi feito com GlnK.

Visto que BCCP é uma subunidade de uma enzima, a ACC, e GlnK neste trabalho esta sendo mostrada como capaz de interagir com holoBCCP, uma pergunta trivial é: GlnK é capaz de interagir somente com holoBCCP ou com todo o complexo da ACC? Para tentar responder essa pergunta, foi realizado um ensaio de *pull down* em resina de níquel com as formas disponíveis no laboratório das proteínas His-BC, usada como isca por possuir cauda de histidina, e as formas nativas de holoBCCP e PII. Em *A. brasilense* há também duas proteínas PII, a GlnZ e a GlnB, e existe um alto nível de similaridade entre as PII de *E. coli* e as de *A. brasilense*, assim como entre as proteínas PII de modo geral, pois trata-se de uma proteína bastante conservada.

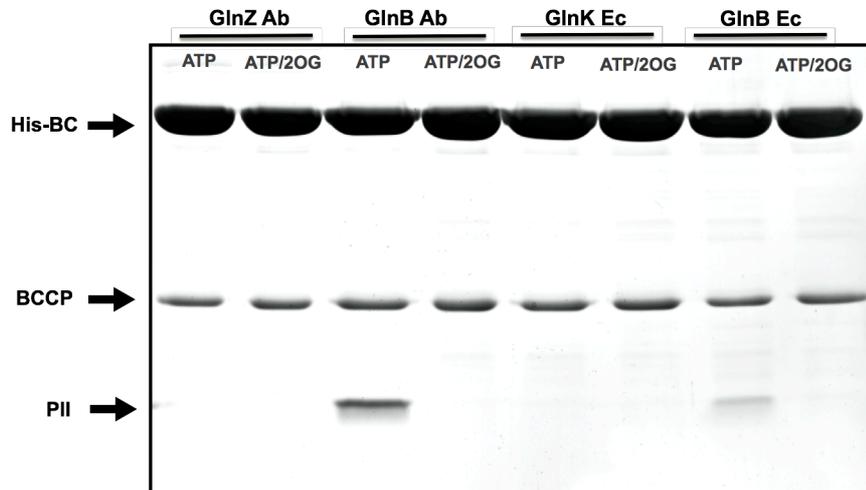


Figura 25 – Formação do complexo ternário BC-BCCP-PII.

Na presença de 3,5 mM de MgATP ou 3,5 mM de MgATP mais 2 mM de 2-OG foram submetidos a ensaio de *pull down* as proteínas conforme indicado na figura. Ensaio de *pull down*, usando 5 μ L de resina de níquel, 15 μ g de BCCP, 10 μ g His-GlnK; SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie Blue.

Sendo assim, foi realizado um ensaio heterólogo de *pull down*, utilizando as proteínas BC e holoBCCP de *E. coli* e as PII de *A. brasilense*, assim como as PII de *E. coli*. Deste modo foi possível verificar que GlnB, de *E. coli* e de *A. brasilense*, formam complexo ternário com BC e holoBCCP enquanto que as proteínas GlnK e GlnZ não foram capazes de ligar ao complexo His-BC + holoBCCP (FIGURA 25).

Na figura 25, se tem a formação do complexo ternário BC-holoBCCP-GlnB, sendo que com a GlnB de *A. brasilense* a interação está mais evidente, visto que a banda referente a GlnB de *A. brasilense* está bastante forte. Já a GlnB de *E. coli* parece ter sido especificamente co-precipitada com o complexo BC-holoBCCP na presença de 3,5 mM MgATP e não co-precipitada na presença de 2 mM de 2-OG. No entanto, a interação entre GlnB de *E. coli* e BC-holo-BCCP está bastante fraca em relação a interação observada quando a GlnB de *A. brasilense* foi utilizada. A explicação para esta discrepância entre GlnB de *E. coli* e de *A. brasilense* ainda não é bem compreendida. Uma hipótese é que as condições experimentais utilizadas não sejam as ideais para interação com a GlnB de *E. coli*. É possível que com algumas mudanças de parâmetros experimentais como pH, tipo e/ou concentração salina, íon metálico, tipo e/ou concentração de detergente no tampão de interação seja possível obter uma condição de interação entre GlnB de *E. coli* e o complexo BC-holoBCCP mais estável. Além disso, novas preparações de GlnB purificada podem ser testadas.

Na figura 25 é apontado que as proteínas GlnZ de *A. brasilense* e GlnK de *E. coli* não formaram complexo com as proteínas BC e holoBCCP de *E. coli*. Foram capazes de interagir com holoBCCP em ensaio de *pull down* usando PII como isca as proteínas GlnZ e GlnB de *A. brasilense*, em ensaio heterólogo, (dados não mostrados) e a proteína GlnK de *E. coli*. Mas, somente apresentou capacidade de interação com o complexo BC-holoBCCP as proteínas GlnB, de *A. brasilense* e *E. coli*. Logo, estes dados sugerem que somente GlnB poderia atuar como um modulador alostérico ou como uma subunidade regulatória dissociável do complexo enzimático ACC.

5.6 Atividade da ACC na presença de GlnB

Sob as mesmas condições do ensaio realizado com GlnB, foi verificada a atividade da ACC na presença de GlnB *E. coli* que mesmo apresentando interação relativamente fraca em ensaio de *pull down*, mostrou ser capaz de inibir a atividade da ACC em cerca de 40% (FIGURA 26). O mesmo efeito foi observado com a GlnB de *A. brasilense*, o que fortalece ainda mais esse resultado (dados não mostrados). Este ensaio mostrou reprodutibilidade em 4 ensaios realizados em duplicata. No entanto, estudos cinéticos se fazem necessários para confirmar a inibição da atividade da ACC por GlnB.

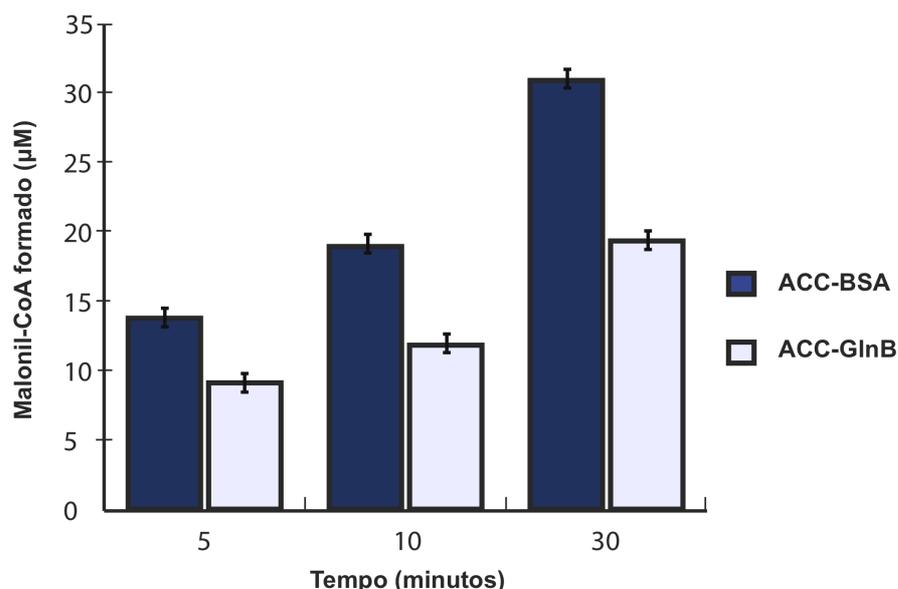


FIGURA 26 – Efeito de GlnB na atividade *in vitro* da acetil-CoA carboxilase de *E. coli*
(A) Formação de malonil-CoA pela ACC foi medido na presença de GlnB 10 µM e de BSA (em mesma quantidade de proteína como controle) foram comparadas nos tempos indicados de reação. A reação foi parada com 10% (v/v) de ácido acético. A reação foi analisada e o malonil-CoA quantificado por LC-MS, com injeção de 5 µL de amostra. O ¹³C malonil-CoA foi usado como controle interno para quantificação.

6 DISCUSSÃO

A enzima acetil-CoA carboxilase é composta por 3 subunidades, a proteína BC (biotina carboxilase), a CT (carboxiltransferase) e a BCCP (proteína carreadora de carboxil-biotina). Essas proteínas foram purificadas pela primeira vez por Guchhait e colaboradores, 1974. Atualmente a purificação das subunidades da ACC está bem estabelecida e neste trabalho tais proteínas foram com sucesso purificadas (FIGURA 13) seguindo protocolo sugerido por Soriano e colaboradores, 2006, com adaptações.

A proteína BCCP, subunidade a qual leva a biotina covalentemente ligada no resíduo de lisina 122, realiza a translocação da biotina do sítio da BC, onde a biotina recebe um grupamento carboxil, para o sítio ativo da CT, local onde o carboxil é transferido para o acetil-CoA (TONG, 2005). A modificação de apoBCCP para holoBCCP pode ser catalisada *in vitro* por BirA, a proteína biotina ligase de *E. coli* (CHAPMAN-SMITH e CRONAN JR, 1999b). Neste trabalho, a BCCP foi biotinizada *in vitro* utilizando adaptações dos protocolos de Soriano *et al.*, 2006 e Chapman-Smith *et al.*, 1994. O diferencial do procedimento no presente trabalho, foi a forma de purificação da BCCP biotinizada em sua forma nativa. A proteína holoBCCP nativa foi capaz de se ligar com bastante afinidade à coluna de heparina, diferentemente da BirA, permitindo a obtenção de BCCP apta para os experimentos propostos neste trabalho. A especificidade da BCCP à heparina pode ser um importante fator de purificação ainda não mostrado. A coluna de heparina submetida ao extrato de proteínas com BCCP superexpressa foi capaz de reter BCCP ainda perante 1M de KCl (FIGURA 15A). Tal afinidade torna desnecessário o uso de BCCP modificadas com marcação de seleção com a finalidade de purificações. Tal afinidade pode ainda ser resultante da capacidade que BCCP possui de se ligar ao DNA, com o intuito de controlar a própria transcrição (JAMES e CRONAN JR, 2004).

A proteína GlnB de *E. coli* possui protocolos na literatura que descrevem várias etapas cromatográficas para se obter GlnB de forma homogênea (SON e RHEE, 1986; VASUDEVAN *et al.*, 1994). Aqui neste trabalho, a GlnB de *E. coli* foi purificada utilizando uma coluna DEAE, que já tinha sido utilizada em outros trabalhos para purificar GlnB. No entanto, a construção do plasmídeo pTRPETGlnB (*glnB* inserida em vetor pET29a) possibilitou uma expressão de GlnB em alto nível

em *E. coli* BL21 (λ DE3), tornando possível a purificação de GlnB em uma única etapa (FIGURA 15C).

A proteína GlnK de *E. coli*, purificada contendo uma cauda de histina N-terminal, foi capaz de interagir com holoBCCP. Essa interação foi observada na presença de MgATP, de maneira dose dependente (FIGURA 19A). O 2-OG foi capaz de bloquear a formação do complexo GlnK-holoBCCP (FIGURA 17) assim como do complexo GlnB-holoBCCP (FIGURA 25). Dose dependente também foi o efeito de 2-OG na formação do complexo GlnK-holoBCCP (FIGURA 19B). Em *A. thaliana*, foi verificada interação entre PII e holoBCCP também sob o favorecimento de MgATP e desfavorecimento de 2-OG (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010). Esse evento mostra-se ser conservado na natureza, não somente no o diz respeito à de formação do complexo entre PII e BCCP, mas também quanto a resposta dessa interação aos efetores alostéricos, principalmente modulada por 2-OG.

A interação entre GlnK e holoBCCP mostrou-se ser dependente dos íons Mg^{2+} ou Mn^{2+} de forma dose dependente. Por sua vez, o Ca^{2+} não foi apto para favorecer o complexo GlnK-holoBCCP (FIGURA 21A). Com base nas K_d (mM) obtidas do ATP em relação ao Mg^{2+} ($7,2 \times 10^{-5}$), Mn^{2+} ($1,7 \times 10^{-5}$) e Ca^{2+} ($1,6 \times 10^{-4}$) (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxcE.htm>) sob as condições de pH e temperatura aplicados aos ensaios de *pull down* realizados neste trabalho, é possível conjecturar que o ATP tem preferência aos íons Mg^{2+} e Mn^{2+} ao invés de Ca^{2+} . E a presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} parece ser importante para ligação simultânea de ATP e 2-OG às proteínas PII (GERHARDT *et al.*, 2012), pois de acordo com dados estruturais, o ATP é apto para ligar-se a PII por intermédio de um metal estabilizado pelo resíduo Q39 na base da volta-T (TRUAN *et al.*, 2010). O íon Ca^{2+} , assim como o Mg^{2+} , foi capaz de atenuar o efeito inibitório do ATP na interação de PII com NAGK em *S. elondatus* (MAHESWARAN *et al.*, 2004), confirmando assim, que o Ca^{2+} pode se complexar ao ATP ligado à PII. No entanto, além da K_d favorecer a complexação do ATP ao Mg^{2+} ou Mn^{2+} em detrimento do Ca^{2+} , a concentração intracelular em *E. coli* de magnésio e manganês (faixa μM) (CHANG, SHUMAN e SOMLYO, 1986) é muito maior que a de cálcio (faixa ηM) (DOMINGUEZ *et al.*, 2004). Além disso, o Mn^{2+} parece ligar-se à PII de forma similar ao Mg^{2+} (GERHARDT *et al.*, 2012). Embora o Ca^{2+} possa formar complexo com o ATP, seu tamanho de raio iônico em comparação com os de Mg^{2+} e Mn^{2+} (HARDING, 2000) possivelmente seja impróprio para o favorecimento de interações proteína-proteína

envolvendo PII na presença de ATP/ADP.

As proteínas PII possuem três sítios de ligação para o ATP/ADP e para o 2-OG. A interação entre GlnK e BCCP foi máxima em concentração de MgATP superiores a 0,5 mM (FIGURA 19A). Na concentração de 0,5 mM de MgATP espera-se que os 3 sítios de ligação de MgATP do trímero de PII estejam saturados (KAMBEROV *et al.*, 1995; RADCHENKO *et al.*, 2010; DA ROCHA *et al.*, 2013; JIANG e NINFA, 2007). Isto sugere que a interação PII-BCCP é maximizada quando PII está saturada com MgATP.

Vale ressaltar que usando uma concentração de MgATP de 0,1 mM a interação ainda foi observada em ensaio de *pull down* (FIGURA 19). Essa concentração não seria capaz de saturar o trímero de GlnK com MgATP. Isso sugere que GlnK, pela ligação a uma ou duas moléculas de MgATP, já é capaz de interagir com BCCP, porém com menos afinidade que GlnK ligada a três MgATP.

Quando sob concentração saturante de MgATP, a ligação de 2-OG para cada sítio de GlnK exibe forte cooperatividade negativa, com K_d de 12, 100 e 5000 μ M (NINFA e JIANG, 2007). Os resultados apresentados na figura 18 e a comparação com estes valores de K_d para 2-OG sugerem que quando 2-OG ocupa os três sítios de ligação na GlnK ocorre a desestabilização da interação de GlnK com BCCP. Estes dados (FIGURA 19) também suportam a hipótese de que GlnK é capaz de interagir com BCCP mesmo quando 1 ou dois sítios de ligação a 2-OG estão ocupados, porém, a interação é de menor afinidade aparente do que aquela observada na ausência de 2-OG (FIGURA 19).

A BCCP biotinilada interagiu com GlnK, diferentemente da BCCP não biotinilada (FIGURA 18). Isso indica que a porção C-terminal de BCCP (região que é biotinilada) seja o sítio de interação com GlnK. Esta hipótese é suportada pelo fato da interação entre BCCP e GlnK não ter sido observada em ensaios de *pull down* em que a holo-BCCP foi imobilizada em resina de avidina através da sua região C-terminal biotinilada ou em ensaios em que holo-BCCP foi imobilizada em resina de níquel através de uma cauda de histidinas C-terminal. É possível que a região de interação de PII na proteína BCCP abranja a região de ligação à biotina e a região *thumb*, a qual interage com a biotina e sofre rearranjo conformacional após biotinilização (ROBERTS *et al.*, 1999)

O domínio C-terminal de holoBCCP foi recentemente demonstrado em estrutura de cristal como sendo a região que interage com BC (BROUSSARD *et al.*,

2013a). Nessa estrutura, aparentemente a região *thumb*, assim como a região de ligação à biotina (a região β -*hairpin turn*), compõe a superfície da BCCP mais exposta ao solvente. Este fato suporta a hipótese de que esta região faça parte do ponto de interação com PII.

A BCCP1 e a BCCP2 de *A. thaliana* foram identificadas em interação com PII (FERIA BOURELLIER *et al.*, 2010). BCCP de *E. coli* e de *A. thaliana* possuem 40% de identidade (BLAST) e há dois resíduos conservados na região *thumb* das BCCPs de *E. coli* e *A. thaliana*, são eles os resíduos P95 e P97, dos quais o P97 é conservado em *E. coli*, *A. thaliana* e *A. brasilense* (FIGURA 27). A biotina interage diretamente com o resíduo T94 em *thumb* de *E. coli* (ATHAPPILLY e HENDRICKSON, 1995) mas esse resíduo não é conservado em *A. thaliana* e *A. brasilense*, assim como em diversos organismos (CRONAN JR e WALDROP, 2002). Pode-se observar alguns resíduos bastante conservados entre as BCCPs de *E. coli*, *A. brasilense* e *A. thaliana* como os resíduos 85-87 e 89, 90, 92, 93, antes de *thumb*, e os resíduos 102, 105, 106, 109, 112, 117, 119-122, 124, 125, 127, 133 e 134 os quais situam-se em torno do sítio de ligação da biotina (K122) na volta β -*hairpin turn*. Entre esses resíduos podem haver resíduos chave na interação com PII. Obviamente, ainda não podemos descartar um envolvimento do domínio N-terminal de BCCP na interação com PII, pois também há resíduos de aminoácidos conservados entre as BCCPs de *E. coli* e *A. thaliana* nessa região.

A interação de PII com holoBCCP foi observada em ensaio de *pull down* com GlnK e GlnB de *E. coli* (FIGURA 17 e 25) e GlnZ e GlnB de *A. brasilense* (dados não mostrados). Entretanto, a formação de um complexo ternário entre BC, holoBCCP e PII foi observada em ensaio de *pull down* (FIGURA 25) somente com a GlnB (de *A. brasilense* e de *E. coli*) e não com as proteínas GlnK (*E. coli*) e GlnZ (*A. brasilense*). A GlnK uridililada e parcialmente uridililada foi apta para interagir com holoBCCP, no entanto, com menor afinidade do que a GlnK não modificada (FIGURA 21B). Isso pode ser um indicativo de que a região da volta-T de PII seja importante para a formação com complexo PII-BCCP, mas não fundamental. No entanto, ensaios preliminares de *pull down* mostraram que GlnB ausente de volta-T não foi hábil para interagir com o complexo BC-holoBCCP (dados não mostrados). Com isso, pode-se sugerir que a formação do complexo binário PII-holoBCCP não é fundamentalmente dependente da volta T, mas sim, a formação do complexo ternário PII-holoBCCP-BC.

Fazendo uma comparação entre as sequências de aminoácidos das PII de *E. coli* e de *A. brasilense* (FIGURA 28) nota-se um resíduo de aspartato (D54) conservado em GlnB de *E. coli* e de *A. brasilense*, mas não em GlnK de *E. coli* e nem em GlnZ de *A. brasilense*. Isso sugere que o resíduo D54 pode ser importante para a formação do complexo ternário PII-holoBCCP-BC. O resíduo D54 de GlnB é bastante próximo da lisina 51 (sítio de uridililação), com isso, provavelmente a adição do radical uridilil poderia afetar a formação do complexo ternário.

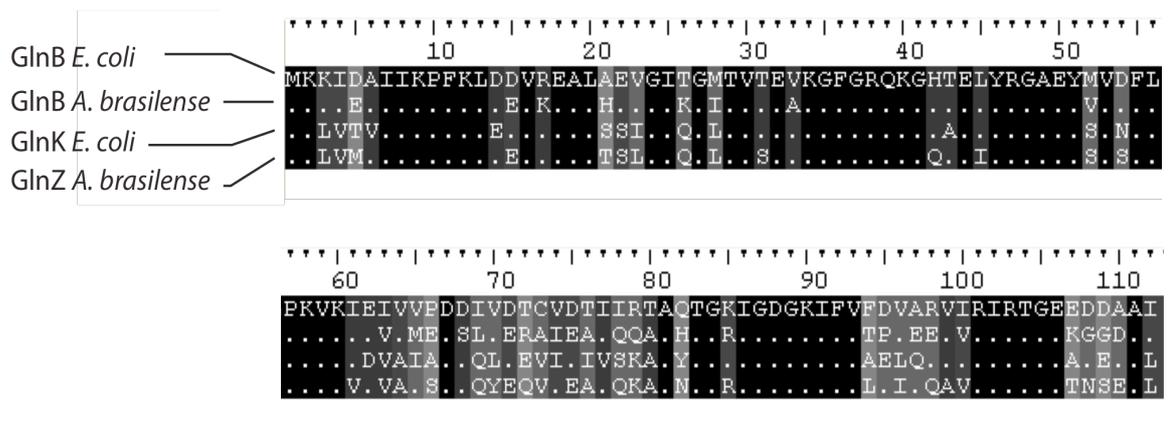


FIGURA 28 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas PII de *E. coli* e *A. brasilense*

Os pontos indicam mesmo aminoácido que o da sequência alinhada acima. Alinhamento em BioEdit.

FONTE: GenBank

Nenhuma das proteínas PII de *E. coli* foi capaz de interagir diretamente com His-BC em ensaio de *pull down* (dados não mostrados). Estes resultados suportam que as proteínas PII interagem somente com a proteína holoBCCP e não com a BC. Entretanto, não se pode descartar que a região de interação entre GlnB e o complexo BC-holoBCCP possa envolver alguma interação direta entre resíduos de aminoácidos da PII e BC.

Pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam a atividade da ACC em *E. coli*. Um dos poucos mecanismo já descritos diz respeito à capacidade de BCCP regular a própria transcrição se ligando na região promotora do operon *accBC* (JAMES e CRONAN JR, 2004). GlnK é capaz de interagir com holoBCCP mas não com o complexo BC-holoBCCP (FIGURA 25), além disso, GlnK não foi capaz de inibir a atividade da ACC (FIGURA 23). Estes dados sugerem que GlnK não tenha um papel fisiológico direto na regulação da atividade da ACC. Entretanto, há a possibilidade de GlnK participar na regulação da ligação de holoBCCP ao promotor

do operon *accBC*, assim, inibindo a atividade da ACC de forma indireta a nível transcricional. Por sua vez, a GlnB seria a proteína que atua regulando a atividade da enzima ACC por interação direta à ACC (FIGURA 25) inibindo-a (FIGURA 26).

Em *A. thaliana*, a PII foi capaz de inibir em até 50% a atividade da ACC. Foi verificado também que PII não alterou o Km do acetil-CoA, mas sim diminuiu a velocidade máxima da reação. Portanto, neste caso a PII poderia ser considerada como uma subunidade regulatória dissociável da enzima ACC (FERIA BOURELLIER *et al.*, 2010). Nos resultados preliminares de atividade da ACC *in vitro* apresentados neste trabalho, a GlnB foi capaz de inibir a atividade da ACC em aproximadamente 40%.

Quanto a essa inibição parcial da ACC por PII, se assim se confirmar, é possível formular a hipótese de que as proteínas PII liguem-se somente à holoBCCP que encontra-se disponível para interação, pois acredita-se que a ACC forme complexos ativos de alta massa entre si (BROUSSARD, *et al.*, 2013b; WALDROP e CRONAN JR, 2002), logo, PII não poderia ter acesso a todas as holoBCCPs desse complexo para interagir e gerar completa inativação da atividade de ACC.

Uma vez identificada à interação entre PII e holoBCCP em *A. thaliana* (FERIA BOURELLIER *et al.*, 2010), em *A. brasilense* e *E. coli* (FIGURA 25), é possível sugerir que tal interação seja um fenômeno universal em organismos que possuem a forma multimérica da ACC e uma proteína da família PII, sendo assim, PII poderia atuar como um regulador universal da forma multimérica da ACC regulando sua atividade de acordo com a disponibilidade de 2-OG.

As proteínas PII atuam em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular, representado pelos níveis de glutamina e de 2-OG. Além disso, o 2-OG é um potencial sinalizador de insuficiência de nitrogênio, é tido também como um potencial sinalizador do estado suficiência de carbono celular (NINFA e ATIKSON, 2000; NINFA e JIANG, 2005; COMMICHAU *et al.*, 2006; YOU *et al.*, 2013). Quando sob altas concentrações de 2-OG, as proteínas PII são uridililadas por GlnD e a medida que sua concentração diminui as PII são desuridililadas e podem ser encontradas, teoricamente, ligadas ao ATP mais 2-OG ou somente ao ATP ou ADP. Como mostrado neste trabalho, a formação do complexo PII-BCCP é sustentada por MgATP na ausência de 2-OG.

O autor You *et al.* (2013) identificou uma estreita relação entre a composição total de proteínas celular e a taxa de crescimento. Essa importante conexão ocorre

por meio da ação dos intermediários do ciclo do ácido cítrico, citrato e 2-OG. O 2-OG é o α -cetoácido mais abundante e serve de esqueleto carbônico para biossíntese de aminoácidos, portanto, é considerado como metabólito mais relevante fisiologicamente do que o citrato. Foi demonstrado que as concentrações de 2-OG atuam modulando, de forma ainda não conhecida, os níveis de cAMP e, conseqüentemente, a repressão catabólica via proteína receptora de cAMP CRP ou CAP. Assim, os níveis de 2-OG determinam se *E. coli* irá direcionar a maquinaria biossintética para biossíntese ou anabolismo (na presença de alto 2-OG) ou para catabolismo (baixo 2-OG).

A regulação da expressão gênica e crescimento celular estariam relacionados da seguinte forma: Sob limitação da carbono, o crescimento celular é lento havendo necessidade do aumento de enzimas catabólicas de carbono e uma diminuição das enzimas anabólicas. O baixo nível de carbono é sinalizado na forma de baixo 2-OG o que leva ao acúmulo de cAMP. Este, por sua vez, se liga a proteína CRP ativando vias catabólicas. Por outro lado, quando a fonte de carbono é abundante há um acúmulo de 2-OG e redução dos níveis de cAMP, isto permite que a maquinaria biossintética de *E. coli* seja direcionada para vias anabólicas, principalmente biossíntese de ribossomos e proteínas (FIGURA 29), permitindo uma alta taxa de crescimento da cultura.

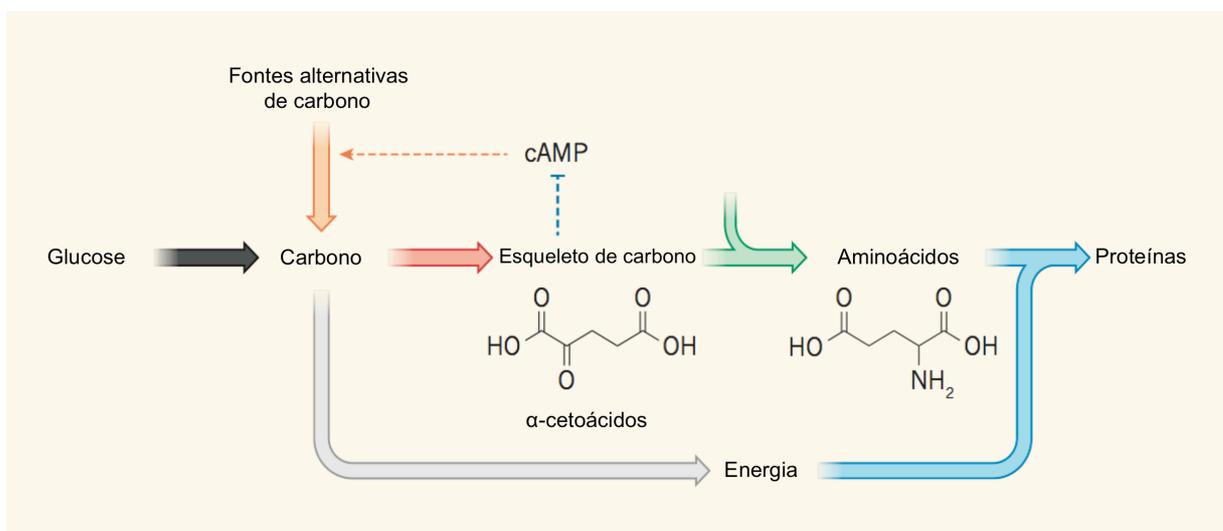


FIGURA 29 – Regulação do metabolismo por 2-OG

FONTES: Rabinowitz e Silhavy (2013)

Os dados apresentados aqui neste trabalho, sugerem que o 2-OG é o principal efetor alostérico de PII que controla a interação PII-BCCP (FIGURA 20), conseqüentemente, regulando a atividade da enzima anabólica ACC. A interação entre GlnB e BCCP é favorecida em baixos níveis de 2-OG, nestas condições GlnB inibe a atividade da enzima ACC. Estes dados estão de acordo com a teoria levantada por You *et al.*, (2013). Em *E. coli*, a biossíntese de lipídeos, iniciada pela enzima ACC, tem como única finalidade a síntese de lipídeos de membrana para crescimento e replicação celular (LI e CRONAN JR, 1993). Assim, quando os níveis de carbono são baixos, há uma redução dos níveis de 2-OG promovendo a interação PII-BCCP e reduzindo a atividade de ACC (FIGURA 30). Assim, em condições de limitação de carbono (baixo 2-OG) haverá menor fluxo através de ACC reduzindo a produção de lipídeos de membrana e a taxa de crescimento celular.

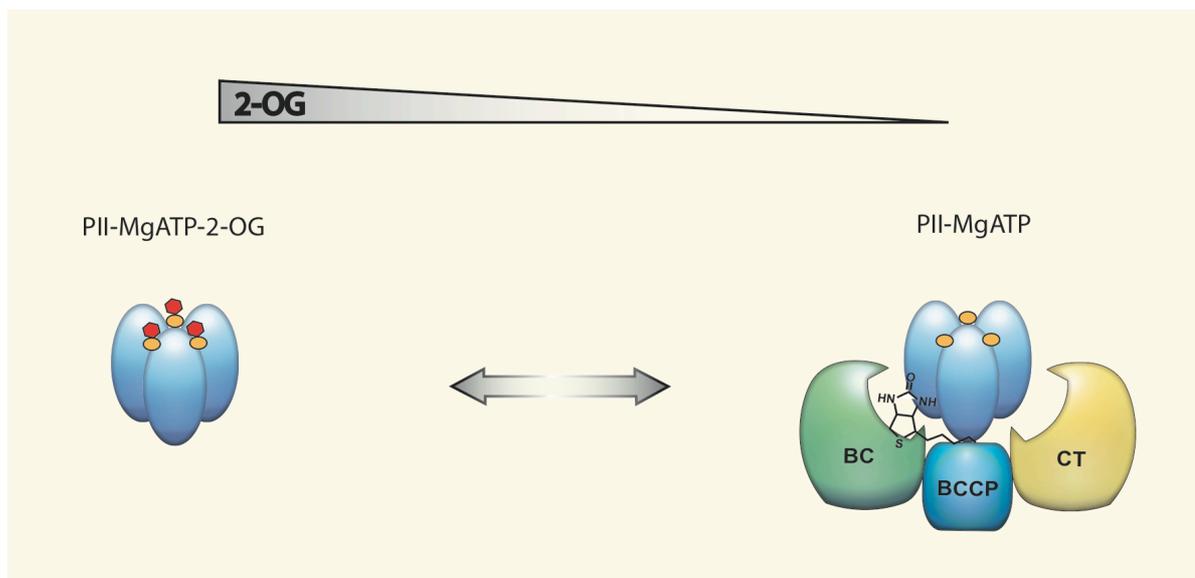


FIGURA 30 – Regulação da ACC por PII

O 2-OG sinaliza o estado de carbono celular, regulando a interação de PII com BCCP quando sob baixa concentração e, assim, inibindo a ACC, logo, a síntese de ácidos graxos. Esferas vermelhas: 2-OG; Esferas amarelas: ATP.

FONTE: O autor

O conhecimento fornecido por este trabalho possibilita, além do enriquecimento científico, o desenvolvimento de recursos no ramo da saúde, da tecnologia e do meio ambiente. Perante mais estudos sobre as implicações biológicas da interação entre PII e holoBCCP, seria possível desenvolver fármacos, antibióticos, biocombustíveis, produtos derivados de hidrocarbonetos, herbicidas e pesticidas (SCHIRMER *et al.*, 2010; HUERLIMANN e HEIMANN, 2013; BOKINSKY

et al., 2011; HOWARD *et al.*, 2013; LENNEN e PFLEGER, 2012; LUO *et al.*, 2012; TONG, 2005).

A síntese de fosfolípidios, constituintes das membranas biológicas, possui como etapa limitante a formação do malonil-CoA pela ACC em Bactéria (LI e CRONAN JR, 1993). Esse controle implica em controle da taxa de crescimento e possivelmente no controle da barreira e comunicação à fatores externos. Essa característica faz da ACC alvo de drogas contra bactérias patogênicas (TONG, 2005; POLYAK *et al.*, 2012). Além disso, a ACC tem sido relacionada a várias patologias em humanos, como a obesidade, o diabetes e o câncer (LUO *et al.*, 2012). Sabendo que PII é capaz de interagir com a ACC, conhecendo bem a forma de interação, a regulação e o efeito fisiológico essa interação, torna-se possível usar esses conhecimentos para desenvolver drogas atuantes sobre a ACC. Os resíduos de aminoácidos importantes na interação entre PII e holoBCCP e na inibição, a priori, da ACC por GlnB poderia subsidiar o desenvolvimento de drogas com afinidade a tais resíduos de aminoácidos afim de bloqueá-los e, assim, inibir a atividade da ACC, fragilizando o crescimento celular e a defesa contra fatores externos da célula bacteriana. Provavelmente esse conhecimento poderia ser aplicado a outros organismos com o mesmo intuito, tendo em vista a característica conservada de ambas as proteínas PII e BCCP.

E. coli é considerada muito promissora para a produção em larga escala de biocombustíveis de qualidade idêntica ao derivado do petróleo (HOWARDS *et al.*, 2013) e com o conhecimento da regulação de ACC, se poderia otimizar a produção de biocombustíveis, reduzindo a dependência que se tem dos combustíveis fósseis. Sendo, a partir de então, fornecido por este trabalho o conhecimento da interação entre PII e BCCP em *E. coli*, torna-se necessário que se efetue mais estudos sobre a forma de regulação dessa interação e sua implicação biológica para que se possa aplicar tal conhecimento na produção de biocombustíveis. Uma vez que é sabido que a superexpressão de ACC aumenta a formação de malonil-CoA em *E. coli*, se houver a confirmação da hipótese aqui formulada de que GlnK auxilia a holoBCCP em sua auto-regulação a nível transcricional (JAMES e CRONAN JR, 2004), uma forma de otimização da produção de biocombustíveis poderia ser a utilização de estirpes de *E. coli* com os genes codificantes para as proteínas PII deletados. Assim, possivelmente, seria esperado que fosse aumentada a taxa de síntese de ácidos graxos. Obviamente serão necessários estudos *in vivo* para testar esta hipótese .

7 CONCLUSÕES

- ✦ As proteínas GlnK e holoBCCP de *E. coli* interagem especificamente somente na presença de MgATP e ausência de 2-OG, de forma dose dependente.
- ✦ O ADP não favorece a interação de GlnK com holoBCCP.
- ✦ A proteína BCCP precisa estar biotinilada para ocorrer a interação GlnK-BCCP.
- ✦ Os íons metálicos Mg^{2+} e Mn^{2+} favorecem de maneira dose dependente a interação GlnK-holoBCCP, Ca^{2+} não.
- ✦ A região C-terminal de PII, assim como o domínio C-terminal de BCCP parecem ser importantes para a interação PII-holoBCCP.
- ✦ A uridililação de GlnK não impede a interação GlnK-holoBCCP, no entanto afeta negativamente a formação do complexo.
- ✦ A proteína GlnB, de *E. coli* e de *A. brasilense*, interagem com o complexo BC-holoBCCP na presença de MgATP e ausência de 2-OG.
- ✦ A proteína GlnK não interage com o complexo BC-holoBCCP, assim como GlnZ de *A. brasilense*.
- ✦ A proteína GlnK de *E. coli* não alterar a atividade da ACC.
- ✦ A proteína GlnB de *E. coli* parece inibir parcialmente ACC em cerca de 40%, assim como a GlnB de *A. brasilense* em sistema heterólogo.
- ✦ A Interação entre PII e holoBCCP é um evento conservado em bactéria, tanto quanto a capacidade de interação entre essas proteínas quanto a forma alostérica de regulação dessa interação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDEL-HAMID, A. M. e CRONAN JR, J. E., Coordinate Expression of the Acetyl Coenzyme A Carboxylase Genes, *accB* and *accC*, Is Necessary for Normal Regulation of Biotin Synthesis in *Escherichia coli*, **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 2, p. 369, 2007.
- ALBERTS, A. W., NERVITAND, M., VAGELOS, P. R., Acetyl-CoA carboxylase II. Demonstration of biotin-protein and biotin carboxylase subunits, **pnas**, v63, 1969.
- ALBERTS, A. W., GORDON, S. G. e VAGELOS, P. R., Acetyl CoA Carboxylase: The Purified Transcarboxylase Component, **pnas**, v. 68, n. 6, p. 1259-1263, 1971.
- ARAÚJO, L.M., HUERGO, L.F., INVITTI, A.L., GIMENES, C.I., BONATTO, A.C., MONTEIRO, R.A., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., CHUBATSU, L.S. Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon *in vitro* uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.41, n.4, p.289-294, 2008.
- ARAÚJO, M. S., BAURA, V. A., SOUZA, E. M., BENELLI, E. M., RIGO, L. U., STEFFENS, M. B. R., PEDROSA, F. O., e CHUBATSU, L. S., *In vitro* uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein, **Protein Expr. Purif.**, v. 33, p. 19-24, 2004.
- ATHAPPILLY, F. K., e HENDRICKSON, W. A., Structure of the biotinyl domain of acetyl-coenzyme A carboxylase determined by MAD phasing, **Structure** 3, p. 1407-1419, 1995.
- BECKERS, G., STROSSER, J., HILDEBRANDT, U., KALINOWSKI, J., FARWICK, M., Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. **Mol. Microbiol.**, p. 58:580–95, 2005.
- BENSON, B. K., MEADES, G., JR., GROVE, A., e WALDROP, G. L., DNA inhibits catalysis by the carboxyltransferase subunit of acetyl-CoA carboxylase: implications for active site communication. **Protein Science**, v. 17, p. 34-42., 2008.
- BILDER, P., LIGHTLE, S., BAINBRIDGE, G., OHREN, J., FINZEL, B., SUN, F., HOLLEY, S., AL-KASSIM, L., SPESSARD, C., MELNICK, M., The structure of the carboxyltransferase component of acetyl-coA carboxylase reveals a zinc-binding motif unique to the bacterial enzyme, **Biochemistry**, v. 45, p. 1712-1722, 2006.
- BLANCHARD, C. Z., LEE, Y. M., FRANTOM, P. A., e WALDROP, G. L., Mutations at four active site residues of biotin carboxylase abolish substrate-induced synergism by biotin. **Biochemistry**, v. 38, p. 3393-3400, 1999.
- BONATTO, A. C., COUTO, G. H., SOUZA, E. M., ARAUJO, 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*, **Protein Expr. Purif.**, v. 55, p. 293–299, 2007.
- BOKINSKY, G., PERALTA-YAHYA, P. P., GEORGE, A., HOLMES, B. M., STEEN, E. J., DIETRICH, J., LEE, T. S., TULLMAN-ERCEK, D., VOIGT, C. A., SIMMONS, B. A. e KEASLING, J. D., Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*, **pnas**, v. 108, p. 19949-19954, 2011.

BROUSSARD, T. C., KOBE, M. J., PAKHOMOVA, S., NEAU, D. B., PRICE, A. E., CHAMPION, T. S., e WALDROP, G. L., The Three-Dimensional Structure of the Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *E. coli* Acetyl-CoA Carboxylase, **Structure**, v. 21, p. 650-657, 2013a.

BROUSSARD, T. C., PRICE, A. E., LABORDE, S. M. e WALDROP, G. L., Complex Formation and Regulation of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase, **Biochemistry**, v. 52, p. 3346-3357, 2013b.

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

CAMPBELL, J. W. e CRONAN JR, J. E., *Escherichia coli* FadR Positively Regulates Transcription of the *fabB* Fatty Acid Biosynthetic Gene, **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 20, p. 5982–5990, 2001.

CAMPBELL, J. W., MORGA-KISS, R. e CRONAN JR, J. E., A new *Escherichia coli* metabolic competency: growth on fatty acids by a novel anaerobic β -oxidation pathway, **Mol. Microbiol.**, v. 47, n. 3, p. 793–805, 2003.

CHANG, C. F., SHUMAN, H. e SOMLYO, A. P., Electron probe analysis, X-ray mapping, and electron energy-loss spectroscopy of calcium, magnesium, and monovalent ions in log-phase and in dividing *Escherichia coli* B cells, **J. Bacteriol.**, v. 167, n. 3, p. 935, 1986.

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

CHOI-RHEE, E. e CRONAN JR, J. E., The Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase, **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 33, p. 30806–30812, 2003

CHOU, C. Y., YU, L. P. C. e TONG, L., Crystal Structure of Biotin Carboxylase in Complex with Substrates and Implications for Its Catalytic Mechanism, **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 11690-11697, 2009.

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

CHAPMAN-SMITH, A., TURNER, D. L., CRONAN, J. E., JR., MORRIS, T. W., e WALLACE, J. C., Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase, **Biochem. J.**, v. 302, n. 3, p. 881-887, 1994.

CHAPMAN-SMITH, A. e CRONAN JR, J. E., Molecular biology of biotin attachment to proteins, **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 477S-484S, 1999b.

CHAPMAN-SMITH, A., e CRONAN JR, J. E., The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, p. 359-363, 1999a.

CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L., MILLER, R. H., One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution, **pnas**,

v.86, p.2172-2175, 1989.

COMMICHAU FM, FORCHHAMMER K & STULKE J, Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism, **Curr Opin Microbiol**, n. 9 p. 167-172, 2006.

CRONAN JR, J. E. & WALDROP, G. L., Multi-Subunit Acetyl-CoA Carboxylases, **Progress in Lipid Research**, n. 41, p. 407–435, 2002.

DA ROCHA, R. A., WESCHENFELDER, T. A., SOUZA, E. M., HUERGO, L. F., e MITCHELL, D. A., Mathematical model of the binding of allosteric effectors to the *Escherichia coli* PII signal transduction protein GlnB, **Biochemistry**, v. 52, n. 15, p. 2683–2693, 2013.

DAVIS, M. S. e CRONAN JR, J. E., Inhibition of *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1499-1503, 2001.

DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues P_{II} and P_Z of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.** v. 29, p.449-463, 1998.

DIACOVICH L., PEIRU S., KURTH D., RODRIGUEZ E., PODESTA F., KHOSLA C., e GRAMAJO, H., Kinetic and structural analysis of a new group of acyl-CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 31228–31236, 2002.

DODSWORTH, J. A., CADY N. C., LEIGH, J. A., 2-Oxoglutarate and the PII homologues Nif11 and Nif12 regulate nitrogenase activity in cell extracts of *Methanococcus maripaludis*. **Mol. Microbiol**, v. 56, p. 1527–38, 2005.

DODSWORTH, J. A., LEIGH, J. A., Regulation of nitrogenase by 2-oxoglutarate- reversible, direct binding of a PII-like nitrogen sensor protein to dinitrogenase, **pnas**, v. 103, p. 9779–84, 2006.

DOMINGUEZ, D. C., Calcium signalling in bacteria, **Mol Microbiol**, v. 54, p. 291–297, 2004

DURAND, A. e 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.

EHLERS, C., WEIDENBACH, K., VEIT, K., FORCHHAMMER, K., SCHMITZ, R. A., Unique mechanistic features of post-translational regulation of glutamine synthetase activity in *Methanosarcina mazei* strain Go1 in response to nitrogen availability. **Mol. Microbiol.** v. 55, p. 1841–54, 2005.

ESPINOSA, J., FORCHHAMMER, K., BURILLO, S., CONTRERAS, A., Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. **Mol. Microbiol**, v. 61, p. 457–69, 2006.

FALL, R. R., NERVI, A. M., ALBERTS, A. W. e VAGELOS, P. R., Acetyl-CoA Carboxylase: Isolation and Characterization of Native Biotin Carboxyl Carrier Protein, **pnas**, v. 68, n. 7, p. 1512-1515, 1971.

FERIA BOURRELLIER A. B., VALOT, B., GUILLOT, A., MBARD-BRETTEVILLE, F., VIDAL, J. e HODGES, M., Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit, **pnas**, n. 107, p. 502-507, 2010.

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

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

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

GIMÉNES-ESPINOSA, R., PLAISANSE, K. L., PLANK, D. W., GRONWALD, J. W., PRADO, R., Propaquizafop absorption, translocation, metabolism, on effects on acetyl-CoA carboxylase in chickpea (*Cicer arietinum* L.), **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 45, p. 140-150, 1999.

GERHARDT, E. C., ARAÚJO, L. M., RIBEIRO, R. R, CHUBATSU, L. S., SCARDUELLI, M., RODRIGUES, T. E., MONTEIRO, R. A., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M & HUERGO, L. F., Influence of the ADP/ATP ratio, 2-oxoglutarate and divalent ions on *Azospirillum brasilense* PII protein signaling, v. 158, p. 1656-1663, 2012.

GUCHHAIT, R. B., MOSS, J., SOKOLSKI, W. e LANE, D. M., The Carboxyl Transferase Component of Acetyl-CoA Carboxylase: Structural Evidence for Intersubunit Translocation of the Biotin Prosthetic group, **pnas**, v. 68, n. 3, p. 653-657, 1971.

GORNICKI, P., FARIS, J., J. KINGS, PODKOWINKI, J., GILL, B. e HASELKORN, R., Plastid-localized acetyl-CoA carboxylase of bread wheat is encoded by a single gene each the three ancestral, **pnas**, v. 94, p. 14179-14184, 1997.

HANRY M. F. e CRONAN JR, J. E., A New Mechanism of Transcriptional Regulation: Release of an Activator Triggered by Small Molecule Binding, **CELL**, v. 70, p. 671-679, 1992.

HARDIE, D. G. e PAN, D. A, Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase, **Biochem. Society Transaction**, v. 30, p. 1064-1070, 2002.

HEINRICH, A., MAHESWARAN, M., RUPPERT, U., FORCHHAMMER, K., The *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase, **Mol. Microbiol.** v. 52. p. 1303–14, 2004.

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. 6661–67, 1998.

HANDKE, P., LYNCH, S. A. e . GILL, R. P., Application and engineering of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* for advanced fuels and chemicals, **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 28–37, 2011.

HARDING, M. M., The geometry of metal-ligand interactions relevant to proteins. II. Angles at the metal atom, additional weak metal-donor interactions. **Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.**, v. 56, p. 857– 867, 2000.

HOLDEN H. M., BENNING M. M., HALLER, T., e GERLT, J. A., The Crotonase Superfamily: Divergently Related Enzymes That Catalyze Different Reactions Involving Acyl Coenzyme A Thioesters, **Acc. Chem. Res.**, v. 34, p. 145-157, 2001.

HOWARD, T.P., MIDDELHAUFE, S., MOORE, K., EDNER, C., KOLAK, D.M., TAYLOR, G.N., Parkera D. A., Leea, R., Smirnoffa, N., Avesa, S. J. E e Lovea, J., Synthesis of customized petroleum-replica fuel molecules by targeted modification of free fatty acid pools in *Escherichia coli*. **pnas** v. 110, p. 7636-7641, 2013.

HUANG, S., SIRIKHACHORNKIT, A., FARIS, J. D., SU, X., GILL, B. S., HASELKORN, R e GORNICKI, P., Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses, **Plant Mol. Biology**, v 48, p. 805–820, 2002.

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

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

HUERLIMANN, R., e HEIMANN, K., Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 33, p. 49-65, 2013.

HUERGO, L. F., NOINDORF, L., GIMENES, C., LEMGRUBER, R. S. P., CORDELLINI, D. F., FALARZ, L. J., CRUZ, L. M., MONTEIRO, R. A., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S., SOUZA E. M. & STEFFENS, M B.R., Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium-induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins, **FEMS Microbiol Lett**, v. 308, p. 40–47, 2010.

HUERGO, L. F., CHANDRA, G. e MERRICK, M., PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond, **FEMS**, 2012.

HUERLIMANN, R., & HEIMANN, K., Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae, **Rev Biotechnol**, v. 33, p. 49-65, 2013.

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

INCLEDON, B. J., E HALL, J. C., Acetyl-Coenzyme A carboxylase: Quaternary structure and inhibition by *Graminidal Herbicides*, **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 57, p. 255-271, 1997.

IRAM, S. H. e CRONAN JR, J. E., The β -Oxidation Systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Are Not Functionally Equivalent, **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 2, p. 599–608, 2006.

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. 1156–62, 1999.

JAMES, E. S., e CRONAN JR, J. E., Expression of two *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase subunits is autoregulated, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 2520-2527, 2004.

JAGGI, R., YBARLUCEA, W., CHEAH E, CARR PD, EDWARDS KJ, OLLIS D & VASUDEVAN SG The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*, **FEBS**, n. 391, p 223-228, 1996.

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

JANOVSKÁ, A., HATZINIKOLAS, G., STAIKOPOULOS, V., MCINERNEY, J., MANO, M. E WITTERT, G.A., AMPK and ACC phosphorylation: Effect of leptin, muscle fibre type and obesity, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 284, p. 1–10, 2008.

JIANG P, ZUCKER P, ATKINSON MR, KAMBEROV ES, TIRASOPHON W, CHANDRAN P, SCHEFKE BR & NINFA AJ, Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors, **J. Bacteriol.**, n. 179, p. 4342-4353, 1997a.

JIANG, P., ZUCKER, P. e NINFA, A. J., Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits, **J. Bacteriol.**, n. 179, p. 4354-4360, 1997b.

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

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

KAMBEROV, E. S., ATKINSON, M. R. e NINFA, A. J., The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP, **J. Biol. Chem.**, n. 270, p. 17797-17807, 1995.

KIM, J. Y, LEE, J. J. e KIM, K. S., Acetyl-CoA carboxylase β expression mediated by MyoD muscle regulatory factor 4 is differently affected by retinoic acid receptor and retinoid X receptor, **Exp. Mol. Med.**, v. 35, n. 1, p. 23-29, 2003.

KIN, K. H., Regulation of mammalian acetyl coenzyme A a carboxylase, **Annu. Rev. Nutr.**, v. 17, p. 77–99, 1997.

KESSLER, P. S., e LEIGH, J. A., Genetics of nitrogen regulation in *Methanococcus maripaludis*, **Genetics**, v. 152, p. 1343–1351, 1999.

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

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

LENNEN, R. M., e PFLEGER, B. F., Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids. **Trends Biotechnol.**, v. 30, p. 659-667, 2012.

LENNEN, R. M., BRADEN, D. J., WEST, R. M., DUMESIC ,J. A., PFLEGER B. F., A Process for Microbial Hydrocarbon Synthesis: Overproduction of Fatty Acids in *Escherichia coli* and Catalytic Conversion to Alkanes, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 2, p. 192-202, 2010.

LEOPOLD, S. R., SAWYER S. A., WHITTAM, T. S. E TARR1 P. I., Obscured phylogeny and possible recombinational dormancy in *Escherichia coli*, **BMC Evolutionary Biology**, v11, p. 183, 2011.

LI, S.J., E CRONAN JR, J.E., The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 855-863, 1992a.

LI, S.J., E CRONAN JR, J.E., Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis, **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 332-340, 1993.

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. 6041–50, 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* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 15472– 81, 2002.

LUO, D. X., TONG, D. J., RAJPUT, S.,WANG, C., LIAO, D. F, CAO, D. & MASER, E., Targeting Acetyl-CoA Carboxylases: Small Molecular Inhibitors and their Therapeutic Potential, **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 169, 2012.

MACNEIL, T., MACNEIL, D. e TYLER, B., Fine-structure deletion map and complementation analysis of the glnA-glnL-glnG region in *Escherichia coli*, **J Bacteriol.**, v. 150, p. 1302–1313, 1982.

MAHESWARAN M, URBANKE C, FORCHHAMMER K., Complex formation and catalytic activation by the PII signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942, **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 55202–10, 2004.

MEADES, G., JR, BENSON, B.K., GROVE, A., AND WALDROP, G.L., A tale of two functions: enzymatic activity and translational repression by carboxyltransferase. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 1217-1227, 2010.

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

MOURE,V.R., RAZZERA,G., ARAUJO,L.M., OLIVEIRA,M.A., GERHARDT,E.C., MULLER-SANTOS,M. ALMEIDA, F., PEDROSA, P. O., VALENTE, A. P., SOUZA, E. M., HUERGO, L.

F., Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step, **Protein Expr. Purif.**, v. 81, p. 83-88, 2012

MOCHALKIN, I., MILLER, J. R., EVDOKIMOV, A., LIGHTLE, S., YAN, C., STOVER, C. K., WALDROP, G. L., Structural evidence for substrate-induced synergism and half-sites reactivity in biotin carboxylase, **Protein Science**, v. 17, p. 1706-1718, 2008.

MUNDAY, M.R, Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase, **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 1059-1064, 2002.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY, **Biodiesel handling and use guide**, 4^a edição, Springfield-USA, Office of Scientific and Technical Information, 2009.

NENORTAS, E. e BEKETT, D., Purification and Characterization of Intact and Truncated Forms of the *Escherichia coli* Biotin Carboxyl Carrier Subunit of Acetyl-CoA Carboxylase, **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 13, p. 7559–7567, 1996.

NINFA AJ & ATKINSON MR, PII signal transduction proteins, **Trends Microbiol**, v. 8, p. 172-179, 2000.

NINFA, A. J. e JIANG, P., PII signal transduction proteins: sensors of alpha- ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism, **Curr Opin Microbiol**, v. 8, p. 168-173, 2005.

OLIVEIRA, M. A. S., AQUINO, B., BONATTO, A. C., HUERGO, L. F., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M., DIXON, R., MONTEIRO, R. A., Interaction of GlnK with the GAF domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA mediates NHP4–regulation, **Biochem.**, v. 94, p. 1041e1047, 2012.

PAWLOWSKI, A., RIEDEL, K. U., KLIPP, W., DREISKEMPER, P., GROSS, S., Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 5240–47, 2003.

PEDRO-ROIG, L., CAMACHO, M., BONETE, M. J., Regulation of ammonium assimilation in *Haloferax mediterranei*: Interaction between glutamine synthetase and two GlnK proteins **BBA**, v. 1834, p. 16–23, 2013.

PÉGORIER, J. P., MAY, C. L. e GIRARD, J., Control of Gene Expression by Fatty Acids, **The Jorna of Nutrition**, v. 134, p. 2444-2449, 2004.

POLYAK, S. W., ABELL, A. D., WILCE, M. C. J., ZHANG, L. & BOOKER, G. W., Structure, function and selective inhibition of bacterial acetyl-CoA carboxylase, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, p.983–992, 2012.

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

ROBERTS, E. L., SHU, N., HOWARD, M. J., BROADHURST, R. W., CHAPMAN-SMITH, A., WALLACE, J. C., MORRIS, T., CRONAN JR, J. E. e PERHAM, R. N., Solution structures of apo and holo biotinyl domains from acetyl-coenzyme A carboxylase of *Escherichia coli* determined by triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry** v. 38, p. 5045-5053, 1999.

RUDNICK, P., KUNZ, C., GUNATILAKA, M. K., HINES, E. R., KENNEDY, C., Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 812–20, 2002.

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

SASAKI, Y., KONISHI, T. e NEGANO, Y., The compartmentation of acetyl-Coenzyme A carboxylase in plants, **Plant. Phisyol.**, v. 108, p. 445-449, 1995.

SCHIRMER, A., RUDE, M. A., LI, X., POPOVA, E., E DEL CARDAYRE, S. B., Microbial biosynthesis of alkanes, **Science**, v. 329, p. 559-562, 2010.

SCHULTE, W., TÖPPER, R., STRACK, R. e MARTINI, N., Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by a multi-gene family: Indication for plastidic localization of at least one isoform, **pnas**, v. 94, p. 3465-3470, 1997.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, **Anal Chem.**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SMITH, C. S., WELJIE, A. M. e MOORHEAD, G. B., Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*, **Plant J.**, n. 33, p. 353-360, 2003.

SON, H. S. e RHEE, S. G., Cascade Control of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase Purification and properties of PII pretein and nucletides sequence of its structure gen, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p. 8690-8695, 1987.

SORIANO, A., RADICE, A. D., HERBITTER, A. H, LANGSDORF, E. F, STAVORD, J. M., CHAN, S., WANG, S., LIU, Y. H. & BLACK, T. A., *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase: Characterization and development of a high-throughput assay, **Anal. Biochem.**, v. 349, p. 268–276, 2006.

STROSSER, J., LUDKE, A., SCHAFFER, S., KRAMER, 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– 47, 2004.

THODEN, J. B., BLANCHARD, C. Z., HOLDEN, H. M., e WALDROP, G. L., Movement of the biotin carboxylase B-domain as a result of ATP binding, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 16183-16190, 2000.

TONG, L., Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 1784-1803, 2005.

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

VAN HEESWIJK, W. C., RABENBERG, M., WESTERHOFF, H. V., KAHN, D., The genes of the glutamine synthetase adenylation cascade are not regulated by nitrogen in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 9, p. 443-457, 1993.

VASUDEVAN, S. G., GEDYE, C., DIXON, N. E., CHEAH, E., CARR P. D., SUFFOLK, P. M., JEFFREY, P. D. E OLLIS, D. L., *Escherichia coli* PII protein: purification, crystallization and oligomeric structure, **FEBS Lett.**, v. 337, p. 255–258, 1994.

ZHANG, Y., POHLMANN, E. L., ROBERTS, G. P., GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 1254–65, 2005.

ZHANG, Y., POHLMANN, E. L., SERATE, J., CONRAD, M. C. & ROBERTS, G. P., Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein, **J Bacteriol**, v. 192, p. 2711–2721, 2010.

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

YAN, D., LENZ, P. e HWA, T., Overcoming fluctuation and leakage problems in the quantification of intracellular 2-oxoglutarate levels in *Escherichia coli*, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 6763–6771, 2011.

YÜKSEL e YÜKSEL, The use of ethanol–gasoline blend as a fuel in an SI engine, **Renewable Energy**, v. 29, p. 1181–1191, 2004.

YAO, X., WEI, D., SODEN, C., JR, SUMMERS, M. F., BECKETT, D., Structure of the carboxy-terminal fragment of the apo-biotin carboxyl carrier subunit of *Escherichia coli* acetyl- CoA carboxylase, **Biochemistry**, v. 36, p. 15089-15100, 1997.

YOU, C., OKANO, H., HUI, S., ZHANG, Z., KIM, M., GUNDERSON, C. W., WANG, Y. P., LENS, P., YAN, D. E HWA, T., Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. **Nature**, v. 500, p. 301-306, 2013.

WALDROP, G. L., RAYMENT, I. e HOLDEN, H. M., Three-dimensional structure of the biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase. **Biochemistry**, v. 33, p. 10249-10256, 1994.

WAKIL, S. J., STOOPS, J. K. e JOSHI, V. C. Fatty acid synthesis and its regulation, **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 537-579, 1983.

WAKIL, S. J., e ABU-ELHEIGA, L. A., Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome, **Journal of Lipid Research**, p. 138-143, 2009.

WILSON, K., SHEWCHUK, L. M., BRENNAN, R. G., OTSUKA A.J., MATTHEWS, B. W., *Escherichia coli* biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains, **pnas**, v. 89, p. 9257–61, 1992.