

MARCELO CONSTANTINO ASSUMPÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA NtrX DE *Azospirillum brasilense*

Tese apresentada à Coordenação do curso de
Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Doutor em Ciências – Bioquímica.
Orientadora: Prof^a. Elaine Machado Benelli
Co-orientador: Prof. Fábio de Oliveira Pedorsa

CURITIBA

2007

MARCELO CONSTANTINO ASSUMPÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA NtrX DE *Azospirillum brasilense*

CURITIBA

2007

*Dedicado à memória de
Hamilton Constantino e
Antônio Assumpção.*

AGRADECIMENTOS

Auxílio financeiro: CNPq, CAPES, PRONEX, Fundação Araucária e Paraná Tecnologia;

Aos orientadores professora Elaine Machado Benelli e professor Fábio de Oliveira Pedrosa;

Ao professor Emanuel Maltempi de Souza pela leitura e sugestões da tese e do artigo;

Ao professor M. Geoffrey Yates pela leitura crítica do artigo;

Às professoras Rose Adele Monteiro e Maria Berenice R. Steffens pela leitura crítica da tese na banca interna;

Aos professores membros da banca de defesa de tese: Professora Luciane Passaglia, professor Hernán Terenzi, professora Cyntia M. Fadel Pichet e professora Rose Adele Monteiro, pela leitura da tese e participação na banca de defesa;

Aos demais professores do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio;

Ao apoio técnico: Valter A. de Baura, Roseli Prado e Julieta Pie;

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular;

Ao professor Marco F. M. Corrêa pela ajuda nas análises estatísticas;

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica;

Aos amigos do laboratório 275: Ana C, Magda, Ju Inaba e Gus;

Aos demais colegas de laboratório;

Aos meus pais, irmãos e familiares;

À minha namorada querida Gisele!

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Transdução de sinal em bactérias.....	1
1.2 Sistemas de dois-componentes.....	1
1.3 Ativação da transcrição via proteínas reguladoras de resposta (RR).....	4
1.3.1 Características estruturais das EBPs.....	5
1.3.2 Domínio regulatório.....	7
1.3.3 Domínio central: AAA+.....	8
1.3.4 Domínio C-terminal: HTH.....	10
1.4 Sistema de dois-componentes em microrganismos fixadores de nitrogênio.....	12
1.5 O sistema NTR.....	13
1.6 O operon <i>ntrYX</i>	16
1.7 Justificativa.....	19
2 OBJETIVO.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Microrganismos e plasmídeos.....	21
3.2 Meios de cultivo.....	22
3.3 Antibióticos.....	23
3.4 Condições de cultivo e estoques de bactérias.....	23
3.5 Manipulação do DNA.....	23
3.5.1 Mini-preparação de plasmídeos.....	23
3.5.2 Preparação rápida de plasmídeos.....	24
3.5.3 Clivagem do DNA por endonucleases de restrição.....	24
3.5.4 Purificação de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão.....	25
3.5.5 Ligação.....	25

3.5.6	Transformação bacteriana.....	26
	a. Preparo de células eletrocompetentes.....	26
	b. Eletroporação.....	26
3.5.7	Eletroforese de DNA em gel de ágar e agarose.....	26
	a. Eletroforese analítica.....	26
	b. Eletroforese preparativa.....	27
3.6	Obtenção da proteína NtrX S.Tag N-truncada de <i>A. brasilense</i>	27
3.6.1	Clonagem do gene <i>ntrX</i> N-truncado no vetor de expressão pET29a+.....	27
3.6.2	Indução da superexpressão da proteína NtrX S.Tag N-truncada.....	28
3.6.3	Dosagem de proteínas totais.....	29
3.6.4	Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	29
3.6.5	Solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada.....	30
3.6.6	Purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada.....	31
3.6.7	Purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada por ligação específica à agarose – S.Tag.....	32
3.7	Caracterização da proteína NtrX S.Tag N-truncada.....	33
3.7.1	Análise estrutural dos domínios da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i>	33
3.7.2	Análise da proteína NtrX S.Tag N-truncada por espectrometria de massa tipo MALDI-ToF/MS.....	33
3.7.3	Determinação da atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada.....	34
3.8	Análises estatísticas.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Análise estrutural dos domínios da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i>	36
4.2	Clonagem do gene <i>ntrX</i> N-truncado no vetor de expressão pET29a+.....	50
4.3	Indução da superexpressão da proteína NtrX S.tag N-truncada.....	50
4.4	Purificação da proteína NtrX S.tag N-truncada.....	55
4.5	Análise da proteína por espectrometria de massa tipo MALDI-ToF/MS.....	57
4.6	Determinação da atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada.....	59
5	CONCLUSÕES	65
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Bactérias e plasmídeos.....	21
Tabela 2	Passos de purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada expressa em <i>E. coli</i> estirpe BL21A1.....	56
Tabela 3	Valores das massas moleculares dos peptídeos detectados pelo espectrômetro de massa tipo MALDI-ToF/MS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ativação da transcrição de genes dependentes de proteínas EBPs-RRs.....	6
Figura 2	Estrutura e organização dos domínios AAA+.....	11
Figura 3	Esquema da regulação da fixação de nitrogênio e da utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelo sistema NTR em <i>A. brasilense</i>	15
Figura 4	Representação esquemática dos domínios funcionais das proteínas NtrY de <i>A. brasilense</i>	18
Figura 5	Representação esquemática dos domínios funcionais das proteínas NtrX de <i>A. brasilense</i>	18
Figura 6	Esquema de clonagem do gene ntrX N-truncado no vetor de expressão pET29a+.....	28
Figura 7	Alinhamento estrutural das seqüências de aminoácidos do domínio N-terminal da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i>	40
Figura 8	Alinhamento estrutural das seqüências de aminoácidos do domínio central da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i>	42
Figura 9	Alinhamento estrutural das seqüências de aminoácidos do domínio C-terminal da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i>	44
Figura 10	Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i> com outras proteínas NtrX.....	45

Figura 11	Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i> com proteínas NtrC de <i>A. brasilense</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. typhimurium</i>	46
Figura 12	Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i> com as proteínas NtrC1 de <i>A. aeolicus</i> e DctD de <i>S. meliloti</i>	47
Figura 13	Modelo estrutural calculado para os domínios funcionais da proteína NtrX de <i>A. brasilense</i>	48
Figura 14	Árvore filogenética das proteínas que apresentam similaridade de seqüência de aminoácidos com a proteína NtrX de <i>A. brasilense</i>	49
Figura 15	Solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada de <i>A. brasilense</i> superexpressa em diferentes estirpes de <i>E. coli</i>	52
Figura 16	Solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada superexpressa em <i>E. coli</i> BL21A1.....	53
Figura 17	Efeito do DTT na solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada...	54
Figura 18	Perfil da proteína NtrX S.Tag N-truncada após as diferentes etapas cromatográficas.....	57
Figura 19	Cromatograma dos peptídeos produzidos por digestão trípica da proteína NtrX S.Tag N-truncada identificados pelo MALDI-ToF/MS..	58
Figura 20	Gráficos da atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada.....	62
Figura 21	Seqüência de nucleotídeos da região promotora do gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i>	63
Figura 22	Seqüência de nucleotídeos da região promotora do operon <i>ntrYX</i> de <i>A. brasilense</i>	64

RESUMO

A proteína NtrX foi identificada como uma possível proteína ativadora de transcrição de genes envolvidos no controle metabólico de fontes alternativas de nitrogênio, atuando como um membro de um sistema de dois componentes NtrYX. Análises *in silico* da seqüência de aminoácidos da proteína NtrX mostram que esta proteína contém um domínio N-terminal regulador, um domínio central pertencente a família AAA+ e um domínio C-terminal de ligação ao DNA. Para superexpressar e purificar a proteína NtrX, o gene *ntrX*, tendo deletados os oito primeiros codons, foi clonado no vetor pET29a+. A proteína NtrX foi superexpressa com uma fusão S.Tag, na estirpe de *E. coli* BL21AI, usando L-arabinose como indutor e purificada por cromatografia de troca iônica e afinidade. A atividade de ATPase foi medida pelo acoplamento da conversão de ATP a ADP com a oxidação do NADH. A atividade de ATPase de NtrX foi estimulada na presença do promotor dependente do fator σ^{54} - e NtrC-dependente dos genes *glnBA* de *A. brasilense*. A fosforilação por carbamil-fosfato também estimulou a atividade de ATPase, de maneira semelhante à proteína NtrC. Estes resultados sugerem que a proteína NtrX é ativa na forma fosforilada e que pode haver uma interligação entre os sistemas regulatórios NtrYX e NtrBC em *A. brasilense*.

ABSTRACT

The NtrX protein has been identified as a transcriptional activator of genes involved in the metabolic control of alternative nitrogen sources, acting as a member of a two-component regulatory system NtrYX. The *in silico* analysis of the NtrX amino acid sequence shows that this protein contains an N-terminal receiver domain, a central AAA+ superfamily domain and a C-terminal DNA-binding domain. To over-express and purify this protein, the *ntrX* gene, lacking the first eight codons, was cloned into the vector pET29a+. The NtrX protein was over-expressed as an S.Tag fusion protein induced by L-arabinose in the *E. coli* strain BL21AI and purified by ion exchange and affinity chromatography. The ATPase activity of NtrX was measured by coupling the ATP conversion to ADP with NADH oxidation. The ATPase activity of NtrX was stimulated in the presence of the *A. brasilense* σ^{54} - and NtrC-dependent promoter of the *glnBA* gene. Phosphorylation by carbamyl-phosphate also stimulated ATPase, in a manner similar to the NtrC protein. Our results suggest that NtrX is active in the phosphorylated form and that there may be a cross-talk between the NtrYX and NtrBC regulatory systems in *A. brasilense*.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Transdução de sinal em bactérias

Bactérias alteram o seu metabolismo, comportamento, a transcrição de genes e sua morfologia em resposta a flutuações ambientais tais como: a disponibilidade de aceitadores de elétrons da respiração, suprimento de carbono, nitrogênio, fosfato ou mudanças na osmolaridade e temperatura do meio. As bactérias detectam estas variações do meio e as transmitem a alvos intracelulares específicos, como a maquinaria transcricional, enzimas ou um componente celular, como o sistema motor flagelar e conseqüentemente adaptam-se às variações do ambiente (WHITE, 1995).

Essas variações ambientais são detectadas por proteínas sinalizadoras transmembrana, que possuem um domínio detector. Essas proteínas sofrem uma modificação estrutural quando estimuladas por um sinal externo e transmitem esse sinal para uma proteína reguladora modificando sua estrutura. A proteína modificada é a responsável pela resposta ao estímulo externo (WHITE, 1995; STOCK et al, 2000).

A transmissão do sinal extracelular para o meio intracelular pode ocorrer via um sistema de dois componentes ou por um circuito de fosforilação. No sistema de dois componentes o domínio sensor de uma proteína quinase (HK), ao reconhecer o sinal, sofre uma alteração conformacional que resulta na autofosforilação de um resíduo de histidina. Posteriormente, este fosfato é transferido para um resíduo de aspartato no domínio regulador da proteína reguladora de resposta (RR). A proteína reguladora na forma fosforilada é capaz de ativar a transcrição de vários genes (HOCK, 2000).

No circuito de fosforilação, a transdução do sinal difere do sistema de dois componentes, pois este circuito participa de vias com várias proteínas de domínios reguladores e de fosfotransferência. Estes componentes adicionais oferecem mais alvos para regulação destas vias (HOCK, 2000).

1.2 – Sistemas de dois-componentes

Os sistemas de dois componentes acoplam os mecanismos de estímulo-resposta e permitem ao organismo sentir e responder a muitas mudanças das

condições ambientais (STOCK, 2000; NIXON et al, 1986; PARKINSON e KOFOID, 1992). Este sistema de sinalização é encontrado em bactérias, archeas e alguns eucariotos (STOCK et al, 2000).

Os eventos bioquímicos básicos da transdução de sinal nesse sistema foram primeiro descritos por Ninfa e Magasanik (1986) para o sistema NTR, um sistema que controla a expressão de genes em resposta à disponibilidade de nitrogênio.

Os sistemas de dois-componentes são constituídos por uma proteína sensora: uma quinase ou histidina quinase (HPK) e por uma proteína reguladora de resposta (RR). As HPK são auto-fosforiladas, utilizando o ATP como doador do grupamento fosfato, em resposta a um sinal específico. Essa fosforilação regula a atividade da proteína RR (STOCK et al, 2000). Nos sistemas de dois-componentes a proteína quinase sensora possui um domínio de reconhecimento do sinal com função de autoquinase. O sinal causa a ativação da autoquinase, hidrólise do ATP e fosforilação de um resíduo de histidina localizado no sub-domínio de fosfotransferência. Em seguida, este sub-domínio transfere o grupo fosforil para o resíduo de aspartato localizado no domínio de fosforilação da proteína reguladora de resposta.

As sensoras HPK podem estar localizadas na membrana celular contendo um sensor extracelular ou no citoplasma contendo um sensor intracelular (BOURRET et al, 1991). Essas proteínas operam como dímeros que se autofosforilam após perceber o estímulo externo. As HPK interagem com as proteínas RR e transferem o seu grupamento fosfato, geralmente de um resíduo de histidina para um resíduo de aspartato da proteína RR, em uma reação catalisada pela própria proteína RR. Os efetores RR operam como oligômeros que catalisam a formação do complexo aberto de transcrição utilizando ATP e interagindo com a RNA polimerase holoenzima ativando a transcrição de genes em resposta ao estímulo detectado pela proteína HPK (CHANG e STEWART, 1998).

Algumas HPK possuem atividade de fosfatase, podendo catalisar a defosforilação da proteína reguladora de resposta (RR). Essa defosforilação parece envolver um mecanismo que é distinto do reverso da reação de fosfotransferência HPK-RR (CHANG e STEWART, 1998; STOCK et al, 2000). Esse processo envolve três reações de fosfotransferência e a formação de dois intermediários:

1. **Autofosforilação:** $\text{HPK-His} + \text{ATP} \longrightarrow \text{HPK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. **Fosfotransferência:** $\text{HPK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \longrightarrow \text{HPK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$
3. **Defosforilação:** $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{RR-Asp} + \text{Pi}$

Estas três reações requerem íons metálicos divalentes, sendo Mg^{+2} o provável cátion utilizado *in vivo* (STOCK et al, 2000).

As histidinas-quinase (HK) são cataliticamente semelhantes às serina/treonina/tirosinas-quinase. Entretanto, nas serina/treonina/tirosinas-quinase, um fosfoester é formado, enquanto que nas histidinas-quinase forma-se uma fosfoamida. A hidrólise de uma fosfoamida tem uma variação de energia livre (ΔG) mais negativa que a hidrólise do fosfoester (STOCK et al, 1990).

A fosforilação das proteínas reguladoras em um resíduo de aspartato produz um acilfosfato de alta energia (STOCK et al, 2000). A formação deste acilfosfato provavelmente direciona as mudanças conformacionais desta proteína. Assim, o fosfato ligado ao aspartato difere dos fosfatos ligados a serina e treonina, os quais alteram a atividade da proteína pelo efeito eletrostático local (HURLEY et al, 1990; JOHNSON e O'REILLY, 1996).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos das HPK mostra que esta classe de proteínas contém um domínio de 250 aminoácidos responsável pela transferência do grupamento fosfato. Este domínio apresenta atividade de autoquinase e fosfatase e contém o resíduo de histidina que é fosforilado (BOURRET et al, 1991).

Análises de seqüências de aminoácidos das proteínas RR mostram que estas proteínas têm um domínio de aproximadamente 110 aminoácidos que contém um resíduo aspartato que é fosforilado pelas HPK. Em algumas proteínas RR, esse domínio está fundido com outro domínio de atividade efetora (PARKINSON e KOFOID, 1992). Esse domínio efetor é responsável pela ligação ao DNA e ativação da transcrição, bem como a interação com os outros componentes da maquinaria de transcrição, enquanto o domínio de fosforilação é responsável pela interação com a proteína HPK (HAKENBECK e STOCK, 1996).

Em bactérias, a transdução de sinal em resposta a uma grande variedade de estímulos do ambiente é mediada por pares de proteínas que se comunicam uma com a outra por um mecanismo conservado envolvendo fosforilação de proteínas.

Alguns desses sistemas foram identificados e caracterizados em diferentes microrganismos, como o sistema de osmoregulação EnvZ/OmpR (MIZUNO et al, 1982), quimiotaxia CheA/CheY-CheB (SANDERS et al, 1989), controle da esporulação Spo0F-Spo0B-Spo0A (PEREGO et al, 1989), regulação da expressão do regulon fosfato PhoR/PhoB (MAKINO et al, 1986), controle da fixação de nitrogênio FixL/FixJ (TUCKERMAN et al, 2001) e metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio em *Azospirillum brasilense* NtrB/NtrC (MACHADO et al, 1995) e NtrY/NtrX (PAWLOWSKI et al, 1991; ISHIDA et al, 2002).

1.3 – Ativação da transcrição via proteínas reguladoras de resposta (RR)

Na transdução de sinal via sistemas de dois componentes, o sinal extracelular é recebido pela proteína quinase (HK) e transmitido por fosforilação para a proteína reguladora de resposta (RR), que ativará a expressão de vários genes que codificam proteínas envolvidas na resposta ao estímulo externo. Assim, o controle da transcrição de genes estabelece uma resposta coordenada as modificações ambientais (SCHUMACHER et al, 2006).

O principal ponto de controle da transcrição ocorre ao nível da iniciação, processo no qual a RNA polimerase é isomerizada para promover a formação do complexo aberto na região promotora do gene. A RNA polimerase holoenzima é formada pelas subunidades $\alpha_2\beta\beta'\omega$, que formam o núcleo do complexo e associa-se a uma das subunidades sigma, como: σ^{70} , σ^{28} , σ^{32} e σ^{54} , que apresentam especificidade por seqüências de nucleotídeos diferentes, direcionando a RNA polimerase holoenzima para diferentes tipos de promotores (STUDHOLME e DIXON, 2003).

As RNA polimerase σ^{70} ligam-se a seqüências nas regiões promotoras, posicionadas a -35 e -10 pares de base do início de transcrição. Em geral, estes promotores não requerem proteínas ativadoras de transcrição e a regulação da transcrição, neste caso, ocorre via proteínas reguladoras que bloqueiam a ligação da RNA polimerase σ^{70} ao promotor ou a recrutam (revisado por SCHUMACHER et al, 2006).

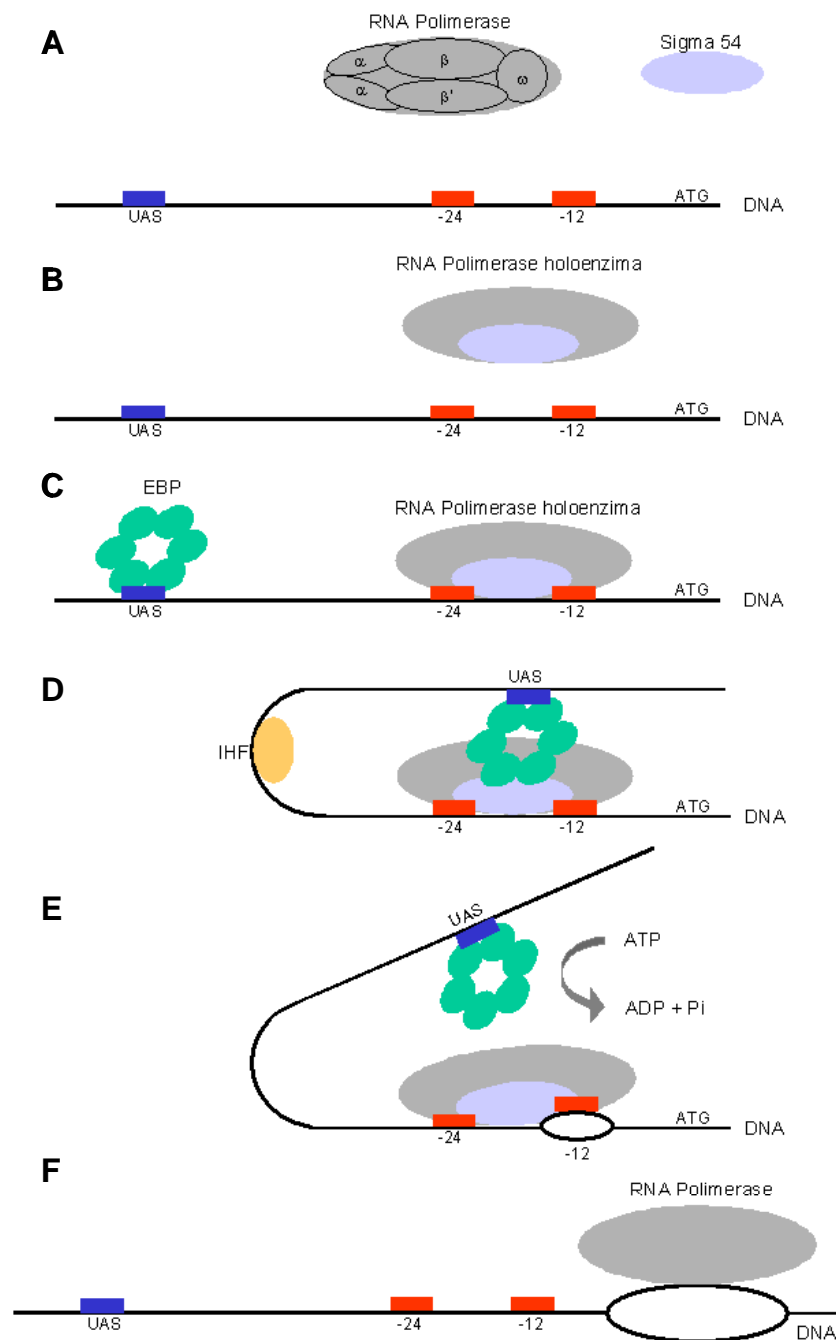
Já as RNA polimerase σ^{54} ligam-se a promotores nas posições -24 (GG) e -12 (GC) do início de transcrição e o complexo formado com o DNA permanece na

forma fechada até que oligômeros da proteína ativadora de transcrição liguem-se ao DNA \pm 100 pares de base a montante do início de transcrição, na região denominada UAS (upstream activator sequence). O dobramento do DNA possibilita que a proteína ativadora toque o complexo fechado. Quando isso ocorre, a proteína ativadora catalisa a hidrólise de nucleotídeos trifosfato e o complexo aberto é formado (BUCK et al, 2000; Figura 1). Como as proteínas ativadoras assemelham-se as “enhancer-binding proteins” de eucariotos (EBPs), elas foram denominadas de EBPs de procariotos (revisado por STUDHOLME e DIXON, 2003).

1.3.1 – Características estruturais das EBPs

Estruturalmente as EBPs apresentam domínios semelhantes. Na região N-terminal, elas apresentam um domínio regulatório, que é o mais variável entre as EBPs pode estar presente; na região central, as EBPs apresentam um domínio AAA+ (chaperone-like ATPase), responsável pela ligação ao fator σ^{54} da RNA polimerase e pela hidrólise do ATP; e na região C-terminal possuem um domínio de ligação ao DNA que apresenta um motivo hélice-volta-hélice (HTH), que possibilita a interação da proteína com o DNA (UAS).

Figura 1: Ativação da transcrição de genes dependentes de proteínas EBPs-RRs



Esquema da ativação da transcrição de genes dependentes de proteínas EBPs-RRs. (A): isomerização da RNA polimerase, (B): Formação do complexo RNA polimerase holoenzima, (C): ligação da proteína no sítio UAS, (D): dobramento do DNA e interação da proteína ativadora com a RNA polimerase holoenzima e formação do complexo fechado, (E): formação do complexo aberto, com a hidrólise de um ATP e (F): desligamento da proteína ativadora e do fator sigma e início da transcrição. Adaptado de DIXON e KAHN, 2004.

1.3.2 – Domínio regulatório

De acordo com o tipo de domínio regulatório presente nas EBPs, Studholme e Dixon (2003) dividem estas proteínas nas seguintes classes:

- a) EBPs que não apresentam domínio regulatório ou sensor. A proteína PspF (phage shock protein F) de enterobactérias, juntamente com as proteínas HrpR/HrpS reguladoras de genes envolvidos na patogenicidade de *Pseudomonas syringae* não apresentam domínio regulatório, e a atividade destas proteínas é controlada por outra proteína, PspA e HrpV, respectivamente;
- b) EBPs que são proteínas reguladoras da resposta de sistemas de dois componentes. Os exemplos melhor descritos desta classe são as proteínas NtrC (proteína reguladora da assimilação de nitrogênio) e a DctA (proteína reguladora do transporte de ácidos dicarboxílicos). Ambas são ativadas por fosforilação de um resíduo de aspartato deste domínio. A fosforilação de NtrC causa oligomerização e ativação da transcrição, enquanto que a fosforilação de DctA alivia a inibição que o domínio N-terminal exerce sobre o domínio AAA+;
- c) EBPs que contém componentes do sistema PTS (sistema de fosfotransferência). As proteínas desta classe apresentam um domínio PRD (PTS regulation domain);
- d) EBPs que contém domínios: GAF, PAS e ACT.

O domínio GAF foi primeiramente identificado na proteína FhlA de *E. coli* que é uma fosfodiesterase-adenilato ciclase que liga o cGMP neste domínio que é o não catalítico. Este domínio também é encontrado na EBP NifA, que é a ativadora transcricional dos genes *nif* envolvidos na síntese do complexo da nitrogenase de bactérias diazotróficas.

O domínio PAS (Per, ARNT e Sim) apesar da baixa similaridade de seqüência é estruturalmente semelhante ao domínio GAF. Este domínio detecta sinais através da ligação com cofatores: heme, flavina e 4-hidroxicinamoil.

O domínio ACT (aspartato-quinase e corismato mutase) é encontrado em uma ampla faixa de enzimas metabólicas que são reguladas pela concentração de aminoácidos. Um par deste domínio liga-se especificamente a um aminoácido regulando a atividade das enzimas relacionandas.

1.3.3 – Domínio central: AAA+

Proteínas que apresentam o domínio AAA+ estão presentes em todos os reinos (HANSON e WHITEHEART, 2005). Este domínio é formado por dois subdomínios: N-terminal (α/β Rossman) e um C-terminal (α -hélices) (Figura 2). O subdomínio α/β Rossman é formado por cinco fitas β , formando uma folha β -paralela, e conectadas por cinco α -hélices. O subdomínio α -hélices é formado por várias α -hélices, que distingue as proteínas da família AAA+ das demais proteínas que ligam nucleotídeos.

Na região N-terminal do domínio α/β Rossman encontra-se um motivo denominado de N-linker que pode ser de dois tipos: um contendo a seqüência glicina-glicina e outro com resíduos hidrofóbicos seguidos por glicina. Esta região é flexível e, provavelmente, está envolvida na propagação das mudanças conformacionais dependentes de nucleotídeos para outros domínios da proteína (revisado por HANSON e WHITEHEART, 2005).

O subdomínio α/β Rossman contém os motivos Walker A (P-loop) e Walker B e uma seqüência característica, denominada mínimo consenso de AAA+, que distingue esta classe de proteínas de outras P-loop ATPases (NEUWALD et al, 1999). Outra característica que as diferenciam das P-loop ATPases é a presença de pelo menos uma α -hélice adicional entre os motivos Walker A e B (Figura 2), que é responsável pela interação com a subunidade sigma-54 da RNA polimerase. Este motivo é chamado GAFTGA.

Na região C-terminal do motivo Walker B, existe um motivo denominado de região de homologia secundária (SRH). Nesta região a seqüência primária é pouco conservada, entretanto, há características estruturais conservadas entre as EBPs: região sensora I e dedos de arginina (Figura 2). Os resíduos da região sensora I, especialmente um resíduo polar conservado posiciona-se entre os motivos Walker A e B e interage com Walker B e γ -fosfato do ATP. Mutações neste resíduo bloqueiam a hidrólise do ATP. Dois resíduos de arginina podem ser encontrados nos dedos de arginina das proteínas da família AAA+, mas somente um deles aparece em todas as proteínas desta família. Na estrutura oligomérica, os dedos de arginina de uma subunidade fazem parte do sítio de ligação de nucleotídeos da subunidade adjacente. Estes resíduos estão envolvidos na hidrólise de nucleotídeos e/ou

propagação de mudanças conformacionais para a forma de hexâmero (revisado por HANSON e WHITEHEART, 2005).

Um resíduo de lisina do motivo Walker A (P-loop GxxxxGKLT/S) é responsável pela interação com o γ -fosfato do ATP. No motivo Walker B (hhhhDE), o resíduo de aspartato é responsável pela interação com o magnésio e o resíduo de glutamato é responsável pela interação com a água, fatores essenciais para a hidrólise do ATP (HANSON e WHITEHEART, 2005; revisado por SCHUMACHER et al, 2006). Aminoácidos essenciais para a atividade de ATPase estão presentes no motivo GAFTGA das proteínas da família AAA+. Esta característica do motivo GAFTGA explica o controle de ligação ao fator sigma pela interação com o ATP. Mutações em resíduos de aminoácidos das regiões de mínimo consenso de AAA+ mostram a perda da atividade de ATPase, mas não da interação com o ATP, mostrando que a oligomerização é essencial para a atividade de ATPase (HANSON e WHITEHEART, 2005). As proteínas da família AAA+ formam uma estrutura geralmente hexamérica, que confere características únicas de sua atividade biológica. Uma delas é o posicionamento do sítio de ligação do ATP na interface das subunidades com a holoenzima (HANSON e WHITEHEART, 2005). De acordo com este arranjo estrutural, uma cavidade central é formada, expondo aminoácidos da região entre os motivos Walker A e B na superfície do poro, que são responsáveis pela ligação do substrato. Mutações nestes aminoácidos afetam a ligação e processamento do substrato, sem afetar a oligomerização ou a atividade de ATPase (YAMADA-INAGAWA et al, 2003).

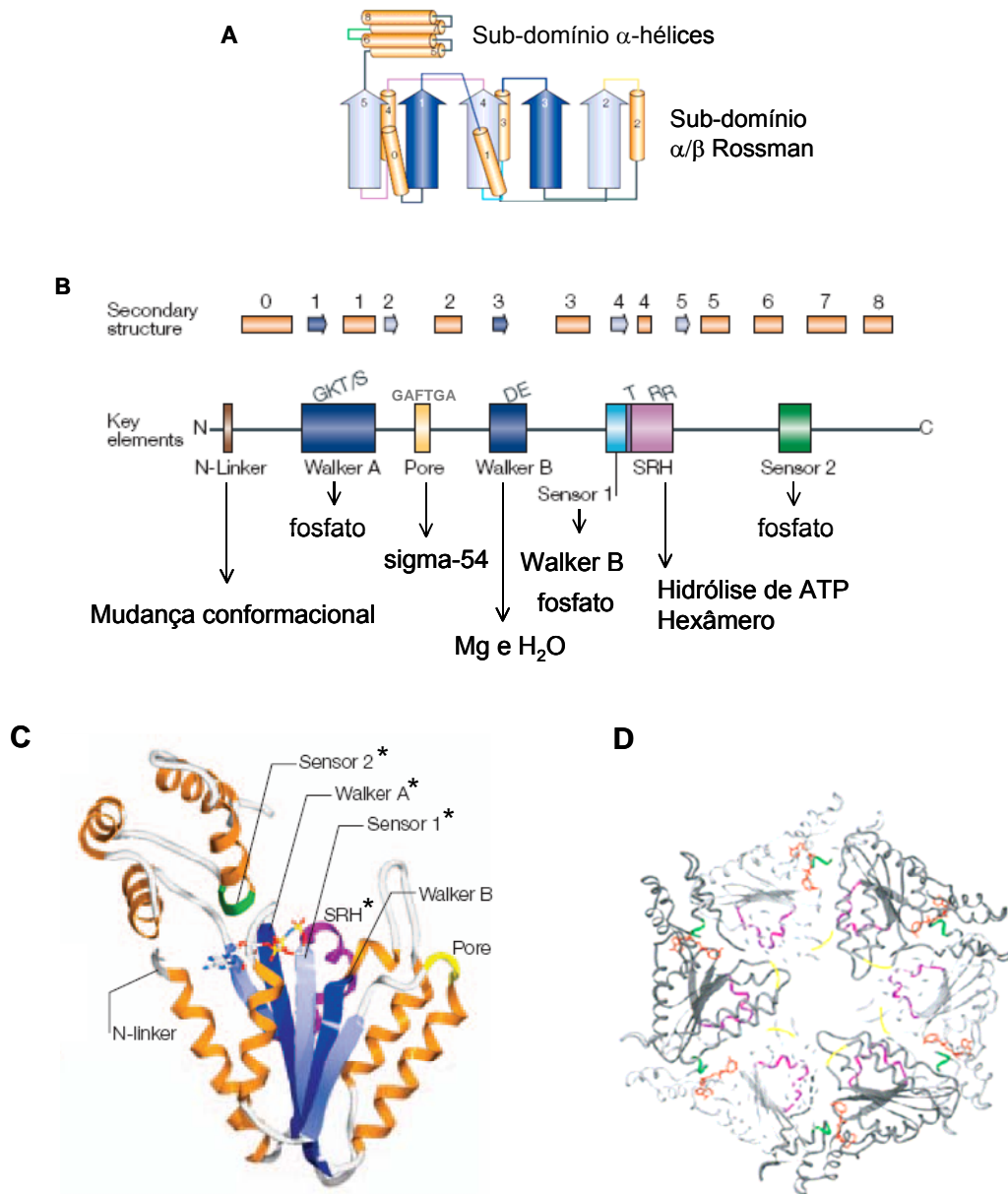
Mutações no motivo GAFTGA mostram a incapacidade de formar o complexo aberto, mas não na hidrólise do ATP, que é semelhante ao da proteína selvagem (CHANEY et al, 1999; SCHUMACHER et al, 2004). Experimentos com a formação de oligômeros estáveis e interação com fator sigma mostram a preferência de interação do fator sigma 54 com proteínas oligomerizadas (CHANEY et al, 1999). Mutação no aminoácido chave do motivo Walker A mostra a perda da capacidade de ligação do ATP (MATVEEVA et al, 1997; BABST et al, 1998). Mutação no aminoácido chave do motivo Walker B mostra a perda da capacidade de hidrólise do ATP, causando a ligação, mas não a liberação do substrato (KARATA et al, 1999; STEEL et al, 2000; HATTENDORF e LINDQUEST, 2002).

Na região C-terminal do subdomínio α -hélices, encontra-se a região sensora II (Figura 2). Um resíduo de arginina deste motivo participa diretamente da interação com o γ -fosfato do ATP.

1.3.4 – Domínio C-terminal: HTH

O domínio C-terminal é responsável pelo reconhecimento da UAS. Os domínios hélice-volta-hélice (HTH) das proteínas ZraR e NtrC formam dímeros por interações entre α -hélices de forma semelhante a Fis (PELTON et al, 1999; SALLAI e TUCKER, 2005).

Figura 2: Estrutura e organização dos domínios AAA+

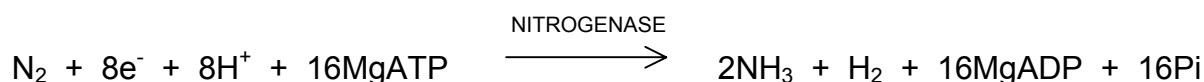


Estrutura esquemática do domínio AAA+. (A): Topologia de um domínio AAA+ e seus sub-domínios; (B): Estrutura secundária e motivos funcionais de um domínio AAA+, mostrando a posição de cada motivo sobreposto às α -hélices (retângulos) e folhas β (flechas). Os aminoácidos importantes dentro de cada motivo estão destacados; (C): Estrutura tridimensional do domínio AAA+, mostrando a disposição dos motivos funcionais e o sítio catalítico (*); (D): Estrutura oligomérica do domínio AAA+. Adaptado: HANSON e WHITEHEART, 2005.

1.4 – Sistema de dois-componentes em microrganismos fixadores de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio consiste na conversão do N₂ atmosférico em amônia. Este processo não é realizado por eucariotos, mas é amplamente distribuído entre bactérias e archeas. Os organismos diazotrofos (fixadores de nitrogênio) são encontrados em uma ampla variedade de habitats, na forma de vida livre no solo e água, em simbioses associativas com gramíneas, simbioses de cianobactérias com várias plantas e nódulos simbióticos nas raízes de leguminosas (revisado por DIXON e KAHN, 2004).

A nitrogenase é o complexo catalítico responsável pela redução do dinitrogênio a amônia, de acordo com a seguinte equação:



Em *Azospirillum brasilense*, um mínimo de dois MgATP são hidrolisados por elétron transferido para cada passo de catálise. Assim, a síntese do complexo da nitrogenase (proteína Fe e proteína Fe-Mo) é rigidamente controlada a nível transcricional em resposta a disponibilidade de nitrogênio fixado. Além disso, a nitrogenase é sensível ao oxigênio e suscetível a regulação pós-traducional mediada pela ADP ribosilação da proteína Fe pela DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase). Esta modificação covalente é revertida pela DraG (dinitrogenase redutase ativando glicohidrolase; revisado por DIXON e KAHN, 2004).

Em proteobactérias, a expressão dos genes *nif* é ativada pela proteína NifA, que é um membro das EBPs e juntamente com a RNA polimerase σ^{54} é capaz de ligar-se a UAS dos genes *nif* e iniciar a transcrição. A expressão de NifA é controlada pelo sistema NTR (ARSENE et al, 1996).

Presente em vários procariotos, o sistema de dois-componentes NtrB/NtrC responde aos níveis extracelulares de nitrogênio (HANKENBECK e STOCK, 1996; XU e HOOVER, 2001; PIOSZAK e NINFA, 2004). A proteína NtrB é a proteína sensora citoplasmática e a sua percepção dos níveis de nitrogênio envolve a participação de proteínas do tipo PII. Em *Azorhizobium caulinodans*, os níveis de amônia são detectados pelos sistemas NtrB-NtrC e NtrY-NtrX, onde NtrY é a

proteína sensora transmembrana que fosforila ou defosforila a proteína NtrX dependendo dos níveis de amônia extracelular (PAWLOWSKI et al, 1991).

Em *A. caulinodans*, os níveis de oxigênio são detectados pelo sistema FixL-FixJ, onde FixL é a proteína sensora que, fosforila a proteína FixJ. Estes sistemas atuam em genes diferentes em diferentes microrganismos. Em *Azorhizobium caulinodans*, os sistemas NtrBC, FixLJ e NtrYX regulam a expressão do gene *nifA*. Em *Sinorhizobium meliloti*, o sistema FixLJ regula a expressão dos genes *nifA* e *fixK* (TON-HOANG et al, 2001). Em *Klebsiella pneumoniae*, o sistema NtrBC regula a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio, a expressão do operon *nifLA* e sua própria expressão.

1.5 – O sistema NTR

A fixação de nitrogênio por microrganismos diazotrofos é um processo dependente de fatores ambientais, tais como baixas tensões de oxigênio e nitrogênio fixado, molibdênio, ferro, enxofre e temperatura adequada, que são detectados por proteínas que fazem parte de sistemas de transdução de sinal (POSTGATE, 1982), chamado sistema NTR. O sistema NTR está envolvido também na regulação do metabolismo de outras fontes de nitrogênio, como nitrito, nitrato e aminoácidos, justificando sua presença também em bactérias não diazotróficas, como *E. coli*.

O sistema NTR é constituído pelas proteínas GlnB (PII), NtrB, NtrC, GS (glutamina sintetase), GlnD (uridilil transferase e removedora de uridilil), GlnE (adenilil transferase e removedora de adenilil) e GlnK ou, em *A. brasilense* GlnZ. Estas proteínas agem em cascata em reações dependentes da razão intracelular de 2-oxoglutarato e glutamina. O par de proteínas quinase e reguladora NtrB/NtrC, constituem o sistema de dois-componentes neste caso (revisado por DIXON e KAHN, 2004).

Em enterobactérias, quando a concentração de amônia intracelular é limitante, a relação glutamina/2-oxoglutarato é baixa, a proteína GlnD tem atividade de uridililtransferase (UTase) e promove a uridililação do resíduo de tirosina 51 da proteína GlnB (ATKINSON et al, 1994). A proteína GlnB uridililada (GlnB-UMP) não interage com a proteína NtrB que sofre autofosforilação no resíduo de histidina 139 (WEISS e MAGASANIK, 1988). Este grupamento fosforil é então transferido da

proteína NtrB (histidina quinase) para o resíduo de aspartato 54 do domínio N-terminal da proteína NtrC (RR), ativando-a (SANDERS et al, 1992; KLOSE et al, 1993). Assim, NtrC-P ativa a transcrição dos promotores dependentes de σ^{54} (rpoN ou NtrA) e dos genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio. GlnB-UMP é capaz de interagir com GlnE e catalisa a desadenililação da GS, ativando-a e a bactéria passa a sintetizar glutamina (de ZAMAROCZY et al, 1993).

Quando os níveis de amônia aumentam, a concentração de glutamina é alta e proteína GlnD tem atividade de enzima removedora de uridilil e desuridilila a proteína GlnB. Na forma desuridililada, GlnB interage com a proteína NtrB, estimulando a atividade de fosfatase desta proteína, a qual catalisa a remoção do grupamento fosforil da proteína NtrC-P, inativando-a (NINFA e ATKINSON, 2000; ARCONDÉGUY et al, 2001). NtrC é incapaz de ativar a transcrição dos genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio e dos genes dependentes do fator σ^{54} da RNA polimerase. A proteína GlnB livre interage com GlnE, que catalisa a adenililação do resíduo de tirosina 397 da GS, inativando-a (MAGAZANIK, 1988).

Em *A. brasilense* o sistema NTR possui proteínas tipo PII (GlnB e GlnZ) e dois sistemas de transdução de sinal (NtrBC e NtrYX) (Figura 3).

Um gene semelhante ao *glnD* foi isolado neste organismo, sugerindo que o sistema NTR de *A. brasilense* responde aos níveis de glutamina e 2-oxoglutarato de forma semelhante a enterobactérias (VAN DOMMELEN et al, 2002; Figura 3).

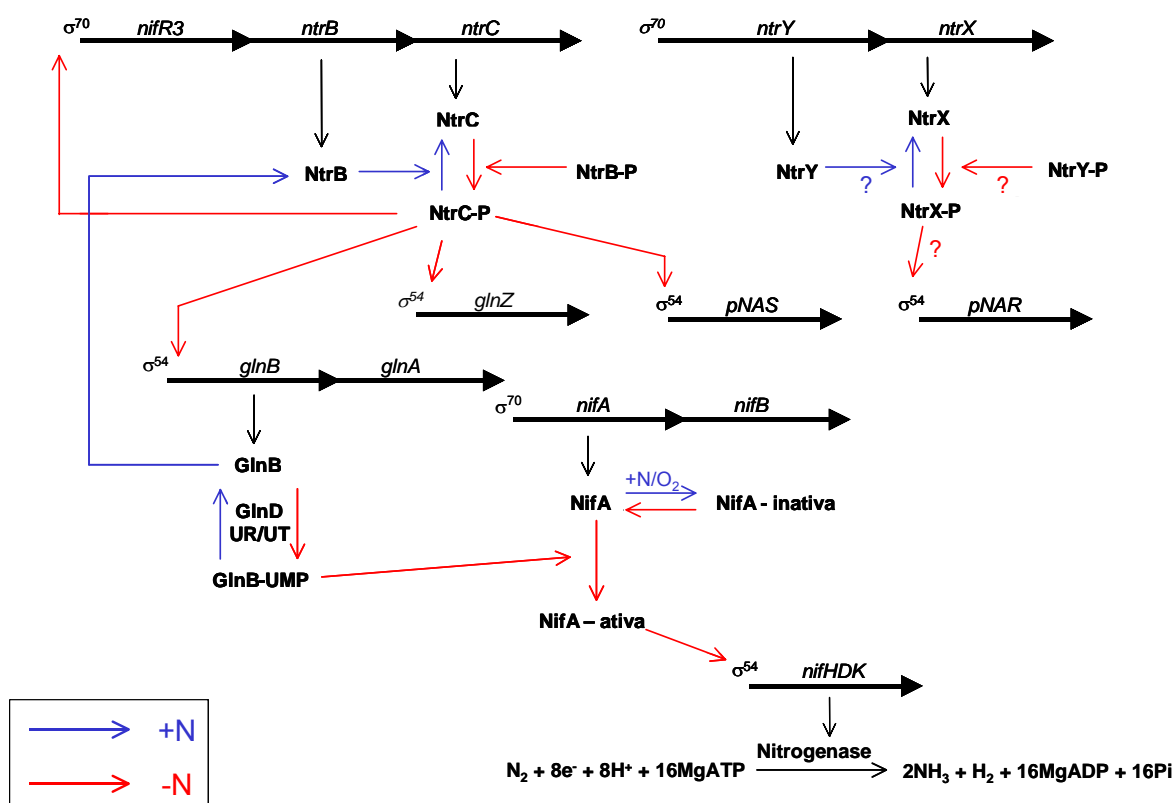
Em *A. brasilense* a expressão da proteína NifA sofre regulação pelos níveis de nitrogênio e oxigênio no meio (LIANG et al, 1991; FADEL-PICHETH et al, 1999). A atividade de NifA requer a proteína GlnB (ARSENE et al, 1996) e provavelmente o domínio N-terminal de NifA está envolvido na interação com GlnB (Figura 3). Esta proteína, ainda, é regulada pelos altos níveis de amônia e oxigênio. Mutações do resíduo (Tyr18→Phe) do domínio N-terminal de NifA torna a atividade desta proteína independente de GlnB, mas ainda regulada por amônia (ARSENE et al, 1999).

A proteína GlnZ é uma paróloga da GlnB em *A. brasilense*, similar a GlnK de enterobactérias (de ZAMAROCZY, 1996). GlnZ é expressa em condições de baixa concentração de amônia (de ZAMAROCZY, 1998). A análise da sequência a montante do gene *glnZ* revelou a presença de um sítio de ligação para NtrC e uma

seqüência consenso para promotor σ^{54} , sugerindo que a expressão de *glnZ* é dependente de NtrC, e expressa somente em concentrações de amônia limitantes.

A expressão do gene *glnB* de *A. brasilense* é ativada pela proteína NtrC em condições de amônia limitantes (HUERGO et al, 2003; Figura 3). A proteína GlnB livre é capaz de interagir com NtrB em condições de excesso de amônia, favorecendo a defosforilação de NtrC (Figura 3). Entretanto, em baixas concentrações de amônia no meio, a proteína GlnB-UMP é essencial para a atividade da proteína NifA, a proteína ativadora dos genes estruturais da nitrogenase (de ZAMAROCZY, et al, 1993; STEENHOUD e VANDERLEYDEN, 2000; Figura 3).

Figura 3: Esquema da regulação da fixação de nitrogênio e da utilização de fontes alternativas de nitrogênio pelo sistema NTR em *Azospirillum brasilense*



Adaptado do esquema original do Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa.

1.6 – O operon *ntrYX*

O operon bicistrônico *ntrYX* possui homologia com o sistema regulatório de dois componentes *ntrBC*, e em *Azorhizobium caulinodans* aparenta ser *ntr*-controlado (NtrC) (PAWLOWSKI et al, 1991). Com o seqüenciamento de diferentes genomas bacterianos, genes homólogos a *ntrYX* foram encontrados em diferentes organismos: *Azorhizobium caulinodans* (PAWLOWSKI et al, 1991), *Zimomonas mobilis* (NCBI, AF176314), *Caulobacter crescentus* (NIERMAN et al, 2001), *Mesorhizobium loti* (NCBI, NC002678), *Rickettsia prowazekii* (NCBI, AJ235272), *Agrobacterium tumefaciens* (NCBI, NC003062), *Sinorhizobium meliloti* (CAPELA et al, 2001), *Neisseria meningitidis* (NCBI, NC003112), *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (NCBI, AF494454), *Rodobacter capsulatus* (DREPPER et al, 2006) e *Herbaspirillum seropedicae* (Genopar: www.genopar.org).

A proteína NtrX é homóloga a proteína NtrC e provavelmente recebe o grupamento fosforil da proteína NtrY, num sistema semelhante ao das proteínas NtrB/NtrC (PAWLOWSKI et al, 1991).

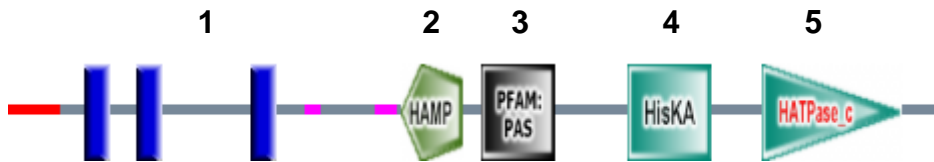
Em *Azorhizobium caulinodans*, NtrY e NtrX são responsáveis pelo controle da fixação de nitrogênio, na presença de amônia, por regulação da expressão de *nifA*, juntamente com NtrB e NtrC. Em casos de mutação nos genes *ntrX* ou *ntrC*, a fixação de nitrogênio em simbiose e vida livre pode ser mediada pelo produto do outro gene (PAWLOWSKI et al, 1991). Uma típica seqüência canônica -24 / -12, dependente de σ^{54} , está presente a montante do gene *nifA* e é importante para a expressão de *nifA* (de BRUIJN et al, 1990), sugerindo que tanto NtrC quanto NtrX possam funcionar como ativadoras de transcrição de NifA em *A. caulinodans*. Recentemente, Drepper et al (2006) mostraram que a proteína NtrC de *R. Capsulatus* pode ser fosforilada tanto pela proteína NtrB quanto pela proteína NtrY. Entretanto, ainda não está claro se a proteína NtrY percebe os sinais de nitrogênio ou se este mecanismo é mediado por GlnB como acontece para NtrB.

O operon *ntrYX* foi também encontrado em *Azospirillum brasilense* (MACHADO, 1995a) e seqüenciado (ISHIDA et al, 2002; ASSUMPÇÃO, 2002). Este operon está localizado a jusante do operon *nifR3ntrBntrC* e possui um promotor tipo σ^{70} da RNA polimerase a montante do gene *ntrY*. O produto do gene *ntrY* é uma proteína transmembrana provável sensora de amônia que possui domínios funcionais que conferem atividade de quinase e fosfatase a esta proteína, e o

produto do gene *ntrX* é uma proteína reguladora de resposta, homóloga a NtrC, que possui domínios estruturais que conferem atividade de ATPase, oligomerização e ativação de transcrição (ASSUMPÇÃO, 2002). A proteína NtrY provavelmente é a responsável pela ativação da proteína NtrX. Os domínios histidina quinase A (HisKA) e histidina quinase-*like* ATPase (H ATPase C) localizados nas regiões central e C-terminal da proteína NtrY (Figura 4) podem interagir com o ATP, recebendo um grupamento fosfato que se liga ao resíduo de histidina no domínio His KA. O domínio H ATPase C possui também a função de transferência deste grupamento fosfato para o resíduo de aspartato localizado na região N-terminal da proteína NtrX, que pode sofrer uma mudança conformacional expondo seus domínios AAA+ e hélice-volta-hélice de interação com o DNA (Figura 5). Com esses domínios expostos, a proteína poderá ligar-se ao DNA e ativar a transcrição, formando o complexo aberto de início de transcrição utilizando a energia do ATP e interagindo com o fator sigma 54 da RNA polimerase (ASSUMPÇÃO, 2002).

A proteína NtrX de *A. brasilense* é necessária para a expressão de genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio, como o nitrato (VITORINO et al, 2001; ISHIDA et al, 2002). O mutante espontâneo de *A. brasilense* HM14, que fixa nitrogênio constitutivamente, é complementado para crescimento em nitrato e atividade controlada da nitrogenase pelos genes *ntrYX*. Como neste mutante o gene *glnB* é expresso constitutivamente, parece que a proteína NtrX é necessária para a regulação da síntese da proteína GlnB (VITORINO et al, 2001).

Figura 4: Representação esquemática dos domínios funcionais da proteína NtrY de *A. brasilense*



Representação dos domínios funcionais da proteína NtrY. Em (1): as regiões transmembrana, (2): o domínio de sinalização transmembrana, (3): o domínio de ligação de fatores de sinalização, (4): o domínio de fosforilação e (5): o domínio de fosfotransferência com atividade de ATPase. A região em vermelho no início da figura representa o peptídeo sinal de ancoragem na membrana (programa SMART, <http://smart.embl-hendenberg.de/>).

Figura 5: Representação esquemática dos domínios funcionais da proteína NtrX de *A. brasilense*



Representação dos domínios funcionais da proteína NtrX. Em (1): o domínio regulatório de fosforilação, (2): o domínio de interação com fator sigma 54 da RNA polimerase com atividade de ATPase e oligomerização e (3): motivo hélice-volta-hélice de ligação ao DNA (programa SMART, <http://smart.embl-hendenberg.de/>).

1.7 – Justificativa

Azospirillum brasilense é uma bactéria gram-negativa, diazotrófica aeróbica, capaz de associar-se às raízes de diversas gramíneas, como milho, trigo, arroz e sorgo (TARRAND et al, 1978).

Estas bactérias são capazes de utilizar N₂ como fonte única de nitrogênio, reduzindo o N₂ atmosférico a NH₃ sob baixas tensões de O₂. O nitrato é também utilizado como fonte única de nitrogênio para crescimento, sendo convertido a NH₃.

Estudos com *Azospirillum sp.* em associação às raízes de gramíneas indicam contribuições significativas de nitrogênio para as plantas associadas (BODDEY et al, 1986), proporcionando um significativo aumento no rendimento da produção de grãos e aumento do peso seco, fósforo, potássio e nitrogênio total nessas plantas (OKON, 1985). Este aumento na produção e crescimento após inoculação com *Azospirillum* tem sido atribuído a um efeito geral no crescimento das raízes e uma conseqüente melhora na capacidade de assimilação de nutrientes pela planta (KAPULNIK et al, 1985; OKON et al, 1988). Este efeito parece ser devido à capacidade destas bactérias de produzir fitormônios (TIEN et al, 1979; de FRANCESCO et al, 1985; HORNEMANS e VLASSAK, 1985; MORGENSTERN e OKON, 1987).

A disponibilidade de nitrogênio fixado é um fator limitante freqüente na produção agrícola, principalmente com o aumento da população mundial e a necessidade de produção de alimento seguro para as pessoas. O aumento no uso de fertilizantes químicos nitrogenados tem sido uma preocupação cada vez maior pela poluição do ar, solo e das águas causado por eles. A utilização de *Azospirillum* como inoculante pode promover um melhor aproveitamento de nutrientes pelas plantas, diminuindo custos de produção em relação ao uso de fertilizantes nitrogenados, e redução da poluição ambiental causada pelo nitrato e seus metabólitos de redução (ISHAC, 1989; IACOPINI e CAPPELINI, 1991).

Estudos do mecanismo de transdução de sinal envolvidos na fixação biológica de nitrogênio em *Azospirillum brasilense* podem contribuir para o desenvolvimento de estirpes geneticamente modificadas que disponibilizem mais amônia para a planta associada. Como o operon *ntrYX* foi identificado em vários microrganismos, incluindo alguns diazotrofos, onde este par regulatório parece estar envolvido no controle da fixação biológica de nitrogênio e no metabolismo nitrogenado,

assim, este trabalho visa contribuir para o entendimento da função da proteína NtrX de *Azospirillum brasilense*.

2 – OBJETIVO GERAL

Caracterização funcional da proteína NtrX S.Tag N-truncada de *Azospirillum brasilense*.

2.1 – Objetivos específicos

- Superexpressar e purificar a proteína NtrX S.Tag N-truncada de *A. brasilense*;
- Caracterizar a atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada de *A. brasilense*;
- Analisar os domínios funcionais da proteína NtrX e comparar com os domínios funcionais de outras EBPs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Microrganismos e plasmídeos

Os microrganismos e plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Bactérias e plasmídeos

<i>Estirpes e Plasmídeos</i>	<i>Genótipo e Fenótipo</i>	<i>Referência</i>
<i>E. coli</i>		
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	Life Technologies
BL21 λ (DE3) codonplus	F- <i>dcm</i> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal</i> (λ DE3)	Stratagene
RosettaBlue (DE3) pLysS	<i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK12- mK12+) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> pLysS RARE2	Novagen
C41 (DE3)	<i>ompT</i> <i>hsdS</i> ($r_B m_B$) <i>gal</i> λ (DE3) contendo pelo menos uma mutação não caracterizada	MIROUX e WALKER, 1996
C43 (DE3)	<i>ompT</i> <i>hsdS</i> ($r_B m_B$) <i>gal</i> λ (DE3) contendo pelo menos duas mutações não caracterizadas, derivado da C41(DE3)	MIROUX e WALKER, 1996
BL21AI	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (r_B - m_B -) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>araB</i> :T7RNAP- <i>tetA</i>	Invitrogen
Plasmídeos		
pTZ18R	Amp ^R , plasmídeo de clonagem e seqüenciamento de DNA	Amersham
pET29a+	Km ^R , plasmídeo de expressão com promotor T7	Novagen
pMCA1	pTZ18R Amp ^R , fragmento de 2,0 kb <i>EcoRI/SphI</i> contendo parte do <i>ntrY</i> e <i>ntrX</i> de <i>A. brasilense</i>	ASSUMPÇÃO, 2002
pETM-x1	pET29a+ Km ^R , fragmento <i>SalI/EcoRI</i> do gene <i>ntrX</i> , clonado nos sítios <i>BglII/EcoRI</i>	Este trabalho
pSPL46	pSPORT2 Amp ^R , fragmento 4,85kb <i>EcoRI/BglII</i> contendo parte do gene <i>ntrC</i> e os genes <i>ntrYX</i>	ISHIDA et al, 2002
pLHglnBTZ	pTZ19R Amp ^R , fragmento <i>XhoI-XbaI</i> derivado do pLHglnBPET3 contendo os promotores <i>glnBp1p2</i>	HUERGO et al, 2003

3.2 – Meios de cultivo

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios de cultura descritos abaixo (SAMBROOK et al, 1989). Estes meios foram esterilizados por autoclavação a 121°C, a uma atmosfera de pressão por 20 minutos.

- Lúria-Bertani (LB)

Componentes	g/L
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10

O pH do meio foi ajustado para 7,5 com NaOH 1 mol/L. O meio sólido, Lúria-Ágar (LA), foi preparado pela adição de 12 g/L de ágar ao meio líquido.

- Terrific-Broth (TB)

Componentes	g/L
Triptona	12
Extrato de levedura	24
Glicerol	4 mL/L
KH ₂ PO ₄	2,3
K ₂ HPO ₄	12,54

- SOB e SOC

Componentes	g/L
Triptona	20
Extrato de levedura	5
NaCl	0,5
KCl	0,186

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 mol/L. O meio SOC é acrescido de 20 mmol/L de glucose.

- Ágar MacConkey (OXOID Ltd)

Componentes	g/L	Componentes	g/L
Peptona	17	NaCl	5
Polipeptona	3	Vermelho neutro	3 x 10 ⁻²
Lactose	10	Cristal violeta	1 x 10 ⁻³
Sais biliares	1,5	Ágar	3,5

3.3 – Antibióticos

As soluções estoque de antibióticos utilizados nos meios de cultura foram preparadas como descrito por Sambrook et al, 1989. As soluções estoque de tetraciclina (Tc) e cloranfenicol (Cm) foram preparadas em etanol 50% e 95%, nas concentrações de 10 e 30 mg/mL, respectivamente, e as concentrações de uso de 10 µg/mL e 30 µg/mL, respectivamente. As soluções de ácido nalidíxico (Nal), estreptomicina (Sm), canamicina (Km) e ampicilina (Amp) foram preparadas nas concentrações de 20 mg/mL, 80 mg/mL, 100 mg/mL e 250 mg/mL, respectivamente, em água ultrapura e esterilizados por filtração em filtro Millipore 0,45 µm. A solução estoque de ácido nalidíxico (Nal) foi neutralizada com NaOH 1mmol/L e então esterilizada por filtração em filtro Millipore 0,45 µm. Todos os antibióticos foram estocados a –20°C e adicionados aos meios de cultura imediatamente antes do uso.

3.4 – Condições de cultivo e estoques de bactérias

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios LB, TB ou SOB a 37°C. As culturas em meio líquido foram incubadas sob agitação a 200 rpm na presença do antibiótico apropriado para cada estirpe. As placas de meio sólido foram incubadas a 37°C estaticamente na presença dos mesmos antibióticos.

As estirpes de *E. coli* foram estocadas a temperatura de –20°C em glicerol 50% (SAMBROOK et al, 1989).

3.5 – Manipulação do DNA

3.5.1 – Mini-preparação de plasmídeos

A extração de plasmídeos de *E. coli* em pequena escala foi feita baseada no método de lise alcalina baseado em Sambrook et al (1989) modificado conforme descrito abaixo.

Cerca de 1,5 mL de cultura de *E. coli*, em fase logarítmica de crescimento, foram coletadas por centrifugação a 13000 rpm por 1 minuto. As células foram ressuspensas em 150µL de tampão GET (50 mmol/L de glucose, 10 mmol/L de EDTA, 25 mmol/L de Tris HCl pH 8,0) e lisadas pela adição de 150 µL de solução de lise (2 mol/L de NaOH e 1% de SDS). A mistura foi neutralizada pela adição de 150

μL de KacF (3 mol/L de acetato de potássio e 1,8 mol/L de ácido fórmico), homogeneizada por inversão e mantida em gelo por 5 minutos para a precipitação do DNA genômico, proteínas e SDS. Em seguida, 80 μL de mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados. O material foi homogeneizado e separado por centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada e o DNA plasmidial foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol 96% e coletado por centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. O DNA foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 20 μL de água ultrapura.

3.5.2 – Preparação rápida de plasmídeos

Cerca de 100 μL de cultura de *E. coli* em fase logarítmica foram coletadas e homogeneizadas com uma solução contendo 40 μL de FSUDS (65 mmol/L de Tris HCl pH 8,0, 1,75 mmol/L de EDTA, 10% de ficoll, 1% de SDS e 0,02% de azul de bromofenol) e 14 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Esta mistura foi agitada em vórtex, centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos e aproximadamente 20 μL do sobrenadante foi aplicado em um gel de agarose e submetido a corrida eletroforética. O DNA foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador U.V.

3.5.3 – Clivagem do DNA por endonucleases de restrição

Amostras de DNA foram usualmente clivadas com 1 ou 2 unidades de enzima de restrição em um volume final de 20 a 100 μL , por 3 horas a 37°C e utilizando o tampão mais adequado para a atividade da enzima indicado pelo fabricante. Uma alíquota de 10% do volume final do sistema foi misturada com FSUDS e aplicada em ágar 1,2% ou agarose 0,8% e submetida a eletroforese para avaliar a eficiência de clivagem. As enzimas de restrição foram inativadas conforme as instruções do fabricante e o DNA do sistema de reação foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol 96%, coletado por centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos, lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em água ultrapura.

3.5.4 – Purificação de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão

Os plasmídeos usados nas sub-clonagens foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,8%, preparada em tampão TAE 1x (40 mmol/L de Tris base, 1 mmol/L de ácido acético, 2 mmol/L de EDTA em pH 8,0). Os géis foram montados utilizando pentes com capacidade para 30 µL de amostra. As amostras foram também misturadas com 0,3 a 0,5 volume de FSUDS antes da aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada em uma voltagem de 20 a 40 V por aproximadamente 4 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com uma solução de azul de metileno a 0,025% por 5 minutos e o excesso de corante retirado com repetidas lavagens com água ultrapura autoclavada, e um pedaço do gel contendo o fragmento de interesse foi removido. O pedaço de gel foi fundido completamente por incubação a 65°C. Em seguida, o volume de agarose fundida foi dobrado com água ultrapura e um volume de uma solução contendo 10 mmol/L de Tris HCl, 0,25 mol/L de NaCl e 1 mmol/L de EDTA e um volume de fenol equilibrado foram adicionados. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi coletada e tratada com 0,25 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (1:1) e separado por centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos. O DNA contido na fase aquosa foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol e mantido em gelo por 15 minutos. O precipitado foi coletado por centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos, lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 12 µL de água ultrapura.

3.5.5 – Ligação

Fragmentos de DNA com pontas coesivas ou pontas cegas foram ligados a vetores linearizados com pontas coesivas compatíveis ou pontas cegas. As misturas de ligação continham uma proporção DNA inserto e vetor de 4:1. Estas concentrações foram estimadas por visualização de uma alíquota do material em eletroforese em gel de ágar 1,2% ou agarose 0,8%. Inicialmente, o DNA inserto, vetor e água ultrapura foram homogeneizados para um volume final de 10 a 15 µL de reação e aquecidos a 65°C por 5 minutos. A ligação dos fragmentos de DNA foi iniciada pela adição de tampão de ligação (50 mmol/L de Tris HCl pH 7,8, 10 mmol/L

de MgCl_2 , 10 mmol/L de DDT, 1 mmol/L de ATP e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de soroalbumina bovina) e 1 unidade de T_4 DNA Ligase. As reações foram incubadas a 18°C por 18 horas.

3.5.6 – Transformação bacteriana

a. Preparo de células eletrocompetentes

As células de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB, sob agitação a 37°C até atingir uma DO_{600} de 0,5 a 0,7. As células foram mantidas em gelo e coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas uma vez com água ultrapura estéril gelada e uma vez com glicerol 10% estéril gelado. As células foram ressuspensas em glicerol 15% e estocadas em alíquotas de 40 μL a temperatura de – 70°C.

b. Eletroporação

Os plasmídeos íntegros ou provenientes de sistemas de ligação foram introduzidos em estirpes de *E. coli* por eletroporação, usando um eletroporador Cell-Porator® Electroporation System (Life Technologies). Uma alíquota de 1 ou 2 μL do sistema de ligação foi misturado a 20 μL de células de *E. coli* eletrocompetentes e transferidos para uma câmara de eletroporação mantida no gelo. Esta mistura foi submetida a um pulso elétrico (4 kV, 200 Ω , 300 μF), coletada, diluída em 1mL de meio SOC e incubada a 37°C por uma hora para a recuperação das células. Em seguida, uma porção das células foi inoculada sobre o meio de cultura sólido com antibióticos apropriados. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias obtidas foram coletadas e analisadas para verificar a presença de plasmídeos, conforme os itens 2.5.2 e 2.6.1.

3.5.7 – Eletroforese de DNA em gel de ágar e agarose

a. Eletroforese analítica

A separação e a estimativa de tamanho de fragmentos de DNA ou plasmídeos intactos foi realizada por eletroforese em gel de ágar 1,2% ou agarose 0,8% submerso em tampão TBE 1x (89 mmol/L de Tris base, 89 mmol/L de ácido bórico, 2 mmol/L de EDTA em pH 8,3) como descrito em Sambrook et al, 1989. O gel foi preparado em tampão TBE 1x. As amostras de DNA foram misturadas em 0,3 a 0,5 volume de FSUDS. A corrida eletroforética foi realizada com aplicação de 40 a

60 V por aproximadamente 3 horas. O gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL por 30 minutos e as bandas foram visualizadas em transluminador de luz ultravioleta.

A massa molecular de fragmentos foi calculada por comparação com padrões de fragmentos de DNA de tamanho molecular conhecido, 1 kb Ladder (Fermentas) ou plasmídeo controle digerido. A massa molecular de plasmídeos intactos foi estimada por comparação com plasmídeos de massa molecular conhecida.

b. Eletroforese preparativa

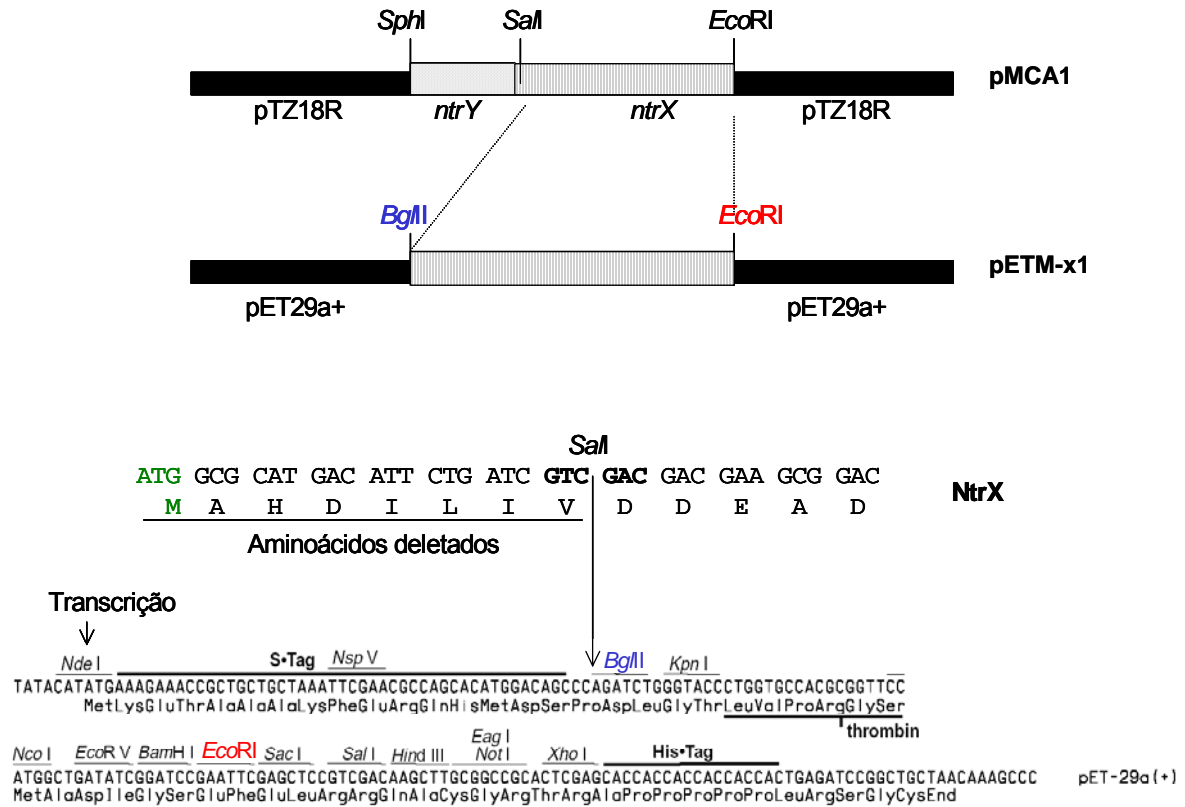
A separação e purificação de fragmentos de DNA para sub-clonagens foram feitas por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,7%, conforme descrito no item 3.5.4.

3.6 – Obtenção da proteína NtrX S.Tag N-truncada de *Azospirillum brasilense*

3.6.1 – Clonagem do gene *ntrX* N-truncado no vetor de expressão pET29a+

O plasmídeo pMCA1 foi digerido com a enzima de restrição *SalI* e tratado com a enzima T4 DNA polimerase para formação de pontas cegas. Em seguida, foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*, gerando um fragmento de aproximadamente 1,4 kb, contendo o gene *ntrX* N-truncado. O vetor pET29a+ foi digerido com a enzima de restrição *BglII* e tratado com a enzima T4 DNA polimerase para formação de pontas cegas. Em seguida, foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (Figura 6). O fragmento do gene *ntrX* e o vetor foram misturados num sistema de ligação (item 3.5.5). Esta mistura de ligação foi transformada em *E. coli* DH10B e os transformantes foram selecionados em meio LA contendo canamicina e estreptomicina. Os plasmídeos destas colônias foram extraídos por rápida preparação de plasmídeos e analisados por eletroforese em gel de ágar 1,2% utilizando o vetor pET29a+ como controle.

Figura 6: Esquema de clonagem do gene *ntrX* N-truncado no vetor de expressão pET29a+



Clonagem do gene *ntrX* N-truncado no vetor de expressão pET29a+. Indicados os oito códons deletados da extremidade N-terminal do gene *ntrX*. Em azul e vermelho, os sítios de ligação do fragmento do gene no vetor pET29a+.

3.6.2 – Indução da expressão da proteína NtrX S.Tag N-truncada

O plasmídeo pETM-x1, que contém o gene *ntrX* de *A. brasilense* N-truncado, foi introduzido por eletroporação em *E. coli* estirpes BL21λ (DE3) codonplus, RosettaBlue (DE3) pLysS, C41 (DE3), C43 (DE3) e BL21AI. As culturas foram induzidas em meio LB contendo o antibiótico canamicina na concentração de 50 µg/mL. A expressão da proteína NtrX S.Tag N-truncada foi induzida pela adição de 0,5% de lactose ou 0,5 mmol/L de IPTG, a 30°C por 3 horas, e pela adição de

concentrações de 0,02%, 0,2% ou 2% de L-arabinose, a 30°C por 4 horas para a estirpe BL21AI.

As estirpes de *E. coli* BL21 λ (DE3) codonplus e RosettaBlue (DE3) pLysS possuem códons raros para *E. coli*, que podem auxiliar a expressão de genes que possuem a relação GC/AT maior, como o caso de genes de *A. brasilense*.

As estirpes de *E. coli* C41 (DE3) e C43 (DE3) possuem mutações não caracterizadas em genes que codificam para proteases. Desta forma, estas estirpes podem ser úteis para expressão de proteínas que não fazem parte do proteoma de *E. coli*, como a proteína NtrX.

A estirpe de *E. coli* BL21AI contém o gene da T7 RNA Polimerase clonado no locus *araB* do operon *araBAD*. Desta forma, esse gene está sob regulação do promotor *araBAD* e seu nível de expressão pode ser regulado variando a concentração de L-arabinose no sistema de indução. Conseqüentemente, a expressão dos genes regulados pelo promotor do fago T7 também será regulada (Invitrogen).

3.6.3 – Dosagem de proteínas totais

As concentrações de proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford, 1976, utilizando soro albumina bovina para a construção da curva de calibração. A determinação da concentração de proteínas em suspensões de células foi realizada pela adição prévia de 0,5 mol/L de NaOH e incubação a temperatura ambiente por 1 hora para lise das células. A leitura da absorbância dos padrões e das amostras foi feita a 595 nm em leitor de placas de 96 poços ELx800 (Bio-Tek Instruments, Inc.).

3.6.4 – Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por Laemmli, 1970. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (12 mmol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de glicerol, 0,4% de SDS, 2 mmol/L de 2-mercaptoetanol e 0,02% de azul de bromofenol). Em seguida, amostras foram aquecidas a 95°C por 10 minutos com tampão de amostra e aplicadas em gel de poliacrilamida. A concentração do gel separador foi de 12%, preparado com a solução estoque de acrilamida (29,2% de acrilamida e 0,8% de N'-N'-Bis metileno acrilamida em água

ultrapura), Tris HCl pH 8,8 e SDS. A polimerização é catalisada com a adição de persulfato de amônio e TEMED. A eletroforese foi corrida por 1 hora e 15 minutos a 180 V em tampão contendo 25 mmol/L de Tris base, 192 mmol/L de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3. Este tampão foi preparado 10 vezes concentrado, mantido a temperatura ambiente e diluído no momento do uso. O gel foi corado com Comassie Blue (0,1% de azul de coomassie R250, 45% de metanol e 10% de ácido acético) por 2 horas e descorado em 40% de metanol e 10% de ácido acético. O gel foi fotodocumentado e empacotado em folhas de celofane.

3.6.5 – Solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada

A expressão da proteína NtrX S.Tag N-truncada (pETM-x1) nas estirpes de *E. coli* BL21 λ (DE3) codonplus, RosettaBlue (DE3) pLysS, C41(DE3) e C43(DE3) foi induzida por 0,5 mmol/L de IPTG a 30°C por 4 horas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e ressuspensas nos seguintes tampões de sonicação:

Tampão 1	Tampão 2	Tampão 3	Tampão 4	Tampão 5
50mmol/L Tris HCl pH8,0	50mmol/L Tris HCl pH8,0	50mmol/L Tris HCl pH8,0	50mmol/L Tris HCl pH8,0	50mmol/L Tris HCl pH8,0
200 mmol/L NaCl	500 mmol/L NaCl	200 mmol/L NaCl	200 mmol/L NaCl	200 mmol/L NaCl
1 mmol/L DTT	1 mmol/L DTT	1 mmol/L DTT	1 mmol/L DTT	1 mmol/L DTT
0,1 mmol/L EDTA	0,1 mmol/L EDTA	0,1 mmol/L EDTA	0,1 mmol/L EDTA	0,1 mmol/L EDTA
50% glicerol	50% glicerol	10% PEG 8000 10% glicerol	0,1% Triton X-100 50% glicerol	0,5% sarcosina 50% glicerol

As amostras foram incubadas com 100 μ g/mL de lisozima por 30 minutos e sonicadas em ciclos de 30 segundos por 6 vezes para lisar as células. O extrato celular foi centrifugado por 25 minutos a 14000 rpm a 4°C. Concentrações iguais de sobrenadante (fração solúvel) e precipitado (fração insolúvel) foram aplicadas em gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12%) para determinar a solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada produzida.

Quando a proteína NtrX S.Tag N-truncada foi expressa na estirpe BL21AI, a lise das células foi realizada por sonicação, como descrito acima, e a solubilidade foi avaliada apenas nos tampões 1 e 2.

Para avaliar o efeito do ditioneitol (DTT) na solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C após a indução da proteína NtrX S.Tag N-truncada em *E. coli* BL21AI e ressuspensas nos seguintes tampões de sonicação:

Tampão 2	Tampão 2A
50 mmol/L Tris HCl pH 8,0	50 mmol/L Tris HCl pH 8,0
500 mmol/L NaCl	500 mmol/L NaCl
1 mmol/L DTT	-
0,1 mmol/L EDTA	0,1 mmol/L EDTA
50% glicerol	50% glicerol

As amostras foram incubadas com 100 µg/mL de lisozima por 30 minutos e sonicadas até a lise completa das células. O extrato celular foi centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o precipitado foi ressuspenso com o mesmo tampão para o volume inicial. Concentrações iguais de sobrenadante (fração solúvel) e precipitado (fração insolúvel) foram aplicadas em gel de eletroforese (SDS-PAGE) 12% para verificar a solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada.

3.6.6 – Purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada

As células ressuspensas em tampão 2 de lise (item 3.6.5) foram incubadas com 100 µg/mL de lisozima por 30 minutos e sonicadas até a lise completa das células. O extrato celular foi centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi diluído 10 vezes com tampão A (50 mmol/L Tris HCl pH 8,0, 50 mmol/L NaCl, 0,1 mmol/L EDTA, 10% glicerol) para diminuir a concentração de glicerol do tampão de sonicação e aplicado em uma coluna de troca aniônica Q-Sepharose de 30 mL (Amersham Biosciences) pré-equilibrada com tampão A e conectada a um sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography, Pharmacia). A amostra foi injetada na coluna com um fluxo de 1 mL/minuto. A coluna foi lavada com tampão A (1 mL/minuto) até a estabilização da linha de base, seguindo de uma segunda lavagem com uma mistura de 25% de tampão B (50 mmol/L Tris HCl pH 8,0, 1 mol/L NaCl, 0,1 mmol/L EDTA, 10% glicerol) e 75% de

tampão A. A proteína foi eluída com um gradiente de NaCl que variou de 250 mmol/L a 1 mol/L. Durante a eluição foram coletadas 30 alíquotas de 5 mL em um fluxo de 1 mL/minuto. As amostras foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) e agrupadas em diferentes frações de acordo com o grau de pureza da proteína.

As amostras obtidas da cromatografia de troca aniônica foram agrupadas conforme o grau de pureza. As amostras foram concentradas em membrana de polietersulfona Vivaspín 6 (Vivascience) e o tampão das amostras foi trocado para o tampão A ou tratadas com sulfato de amônio 75% (1 hora sob agitação a 4°C) e centrifugadas a 18000 rpm por 30 minutos. O precipitado foi dissolvido em 5 mL de tampão A e dialisado em tampão A (12 horas a 4°C sob agitação). As amostras foram aplicadas em coluna de afinidade Agarose-Heparina de 5 mL pré-equilibrada com tampão A e conectada a um sistema FPLC. O sistema foi operado a um fluxo de 1 mL/minuto. A coluna foi lavada com tampão A (1 mL/minuto) até a estabilização da linha de base, seguindo de uma segunda lavagem com uma mistura de 25% de tampão B (50 mmol/L Tris HCl pH 8,0, 1 mol/L NaCl, 0,1 mmol/L EDTA, 10% glicerol) e 75% de tampão A. A proteína foi eluída com um gradiente de NaCl que variou de 250 mmol/L a 1 mol/L. Durante a eluição foram coletadas 30 alíquotas de 1 mL em um fluxo de 1 mL/minuto. As amostras foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) e agrupadas em diferentes frações de acordo com o grau de pureza da proteína e dialisadas em tampão A.

3.6.7 – Purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada por ligação específica à agarose – S.Tag

A proteína NtrX S.Tag N-truncada, expressa a partir do plasmídeo pETM-x1 (item 3.6.1), contém na região N-terminal uma seqüência de aminoácidos, denominada S.Tag (Novagen). Estas proteínas podem ser purificadas por afinidade através do kit de purificação S.Tag rEK (Novagen). Este kit possui uma solução de agarose ligada a anticorpos anti-S.Tag que interage com a seqüência da S.Tag permitindo sua purificação. As frações eluídas da coluna Agarose-Heparina que continham a proteína NtrX S.Tag N-truncada, foram adicionadas à agarose S.Tag em uma proporção de 1 µg de proteína para cada 1 µL de agarose. A ligação foi realizada a temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação leve e constante e centrifugada a 500 x g por 5 minutos para a separação da agarose do sobrenadante,

que foi reservado para a verificação da eficiência de ligação da proteína à agarose S.Tag. Em seguida, a agarose foi lavada 3 vezes com o tampão de lavagem (20 mmol/L Tris HCl pH 7,5, 150 mmol/L NaCl e 0,1% triton X-100) e centrifugada a 500 x g por 5 minutos. A eluição da proteína foi feita com a adição de 1,5 volume de cloreto de magnésio 3 mol/L, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos sob constante agitação leve e centrifugado a 500 x g por 5 minutos seguido da lavagem da agarose com 1,25 mL de tampão de lavagem.

3.7 – Caracterização da proteína NtrX S.Tag N-truncada

3.7.1 – Análises estruturais dos domínios da proteína NtrX de *A. brasilense*

O programa 3DJigsaw (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw>) foi utilizado para obtenção de modelos estruturais para os domínios da proteína NtrX de *A. brasilense*. O alinhamento estrutural dos modelos dos domínios da proteína NtrX de *A. brasilense* com domínios de outras proteínas estruturalmente semelhantes foi realizado utilizando o programa VAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vastsearch.html>). As figuras do modelo estrutural dos domínios da proteína NtrX de *A. brasilense* foram realizadas pelo programa Rasmol (SAYLE e MILNER-WHITE, 1995). O programa Coils (LUPAS, VanDYKE e STOCK, 1991) foi utilizado para verificar as regiões da proteína NtrX de *A. brasilense* que formariam coiled-coil. O programa CLUSTAL W (THOMPSON et al, 1994) foi utilizado para alinhar as seqüências de aminoácidos da proteína NtrX de *A. brasilense* com outras seqüências para analisar a similaridade entre as proteínas.

3.7.2 – Análise da proteína NtrX S.Tag N-truncada por espectrometria de massa tipo MALDI-ToF/MS

A identificação de peptídeos por espectrometria de massa foi realizada para confirmar se a proteína purificada correspondia a NtrX S.Tag N-truncada.

A banda que possui a massa molecular esperada para a proteína NtrX N-truncada foi retirada do gel SDS-PAGE, pelo tratamento com uma solução de 50% de acetonitrila e 25 mmol/L de bicarbonato de amônio pH 8,0 até a descoloração do Coomassie-blue e digerida com 10 µg/mL de tripsina na presença de tampão 40mmol/L de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila, incubado a 37°C por 16

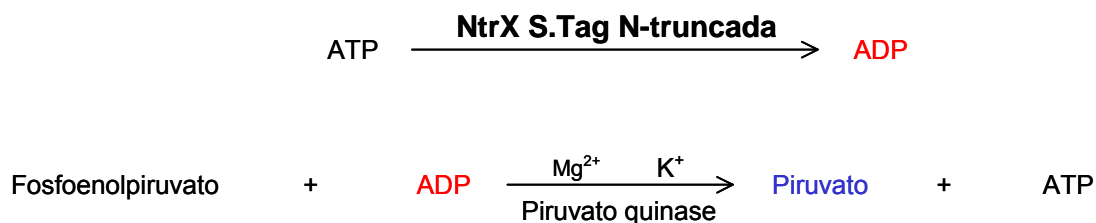
horas. O sobrenadante foi coletado, concentrado e a amostra seca a vácuo foi resuspendida em 10% de acetonitrila. Uma alíquota de 2 μ L desta amostra foi dissolvida em 2 μ L da matriz HCCA (α -Cyano-4-hydroxy cinaminic acids) e aplicada sobre um suporte metálico e colocada no espectrômetro MALDI-ToF após a secagem da amostra no suporte.

Os espectros foram gerados pelo programa Flex Control (Bruker Daltonics) utilizando o método RP1-3 (refrator positivo de 1 a 3 kDa). A identificação dos picos monoisotópicos no espectro foi realizada pelo programa Flex Analysis (Bruker Daltonics). O padrão para comparação do espectro e identificação dos peptídeos foi feito pela digestão *in silico* de uma seqüência de aminoácidos da proteína NtrX, contendo a cauda S.Tag e tendo os primeiros 8 aminoácidos deletados usando o programa MS-Digest (Protein Prospector) selecionando a opção de digestão com tripsina. O aparelho foi previamente calibrado utilizando um calibrador externo.

3.7.3 – Determinação da atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada

A atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada foi medida utilizando um ensaio na qual a produção de ADP é acoplada a oxidação do NADH pela enzima lactato desidrogenase e piruvato quinase (D'AUTRÉAUX et al, 2005). A oxidação do NADH foi monitorada pela absorbância a 340 nm (Varian Cary 3E) a 37°C por 20 minutos. As misturas de reação continham 30 mmol/L de ATP (Sigma), 1 mmol/L de fosfoenolpiruvato (Sigma), 0,25 mmol/L de NADH (Sigma), 7 U de piruvato quinase (Sigma), 23 U de lactato desidrogenase (Sigma) e concentrações de proteína NtrX S.Tag N-truncada de 200, 500 e 1000 nmol/L em tampão 50 mmol/L de Tris HCl pH8,0, 100 mmol/L de cloreto de potássio e 2 mmol/L de cloreto de magnésio, conforme esquema abaixo:

1ª ETAPA



2ª ETAPA



A primeira etapa da reação, contendo a proteína NtrX S.Tag N-truncada, ATP, fosfoenolpiruvato e piruvato quinase foi pré-incubada a 37°C por 5 minutos. Em seguida, a enzima lactato desidrogenase foi adicionada ao sistema de reação e o espectrofotômetro foi zerado. Após a adição de NADH, os valores de absorvância do sistema foram registrados até 20 minutos. A proteína NtrC de *E. coli*, gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Roseli Wassem foi usada como controle positivo e a reação na ausência de proteína NtrX S.Tag N-truncada ou NtrC foi usada como controle negativo do sistema. A atividade de ATPase foi testada também na presença de DNA plasmidial (10 nmol/L), contendo o promotor σ^{54} dos genes *glnBA* e a região de ligação da proteína NtrC (UAS-NtrC) de *A. brasilense* ou o promotor σ^{70} dos genes *ntrYX* de *A. brasilense*. O efeito da fosforilação de NtrX S.Tag N-truncada na sua atividade de ATPase foi avaliada pela adição de 10 mmol/L de carbamil-fosfato aos sistemas. A atividade de ATPase foi definida como a quantidade de ATP (mol/L) hidrolisados por minuto.

3.8 – Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados de ATPase foi realizado no software STATISTICA, utilizando valores de atividade de ATPase em triplicata comparados pelo teste Tukey post-hoc. O nível de significância foi de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análises estruturais dos domínios da proteína NtrX de *A. brasilense*

A partir da seqüência de aminoácidos dos domínios N-terminal, central e C-terminal da proteína NtrX de *A. brasilense* foram obtidos modelos estruturais teóricos para estes domínios através do programa 3DJigsaw (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>). Os alinhamentos estruturais destes modelos com as proteínas presentes no banco de dados de estrutura de proteínas (RCSB Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org>) foram realizados através do software VAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vastsearch.html>). Este programa compara os modelos estruturais teóricos entre as proteínas do banco de dados e alinha os motivos funcionais dos domínios.

O modelo estrutural teórico do domínio N-terminal da proteína NtrX de *A. brasilense* é formado por um motivo $\beta 5/\alpha 5$ (Figura 7 e 13A). O resíduo Asp53 que é provavelmente fosforilado na proteína NtrX encontra-se no final da fita $\beta 3$. Os resíduos envolvidos na fosforilação: Asp 9, Asp 10, Asp 53, Lys 105 e Ser 83 estão próximos formando o sítio ativo da proteína, como observado para a proteína NtrC de *S. typhimurium* (PELTON et al, 1999; Figura 13B). Entre o domínio N-terminal e central existe uma seqüência de ligação (linker, L1) que no modelo estrutural calculado para NtrX aparece organizado de maneira semelhante ao observado para as proteínas NtrC1 de *A. aeolicus* e DctD de *S. meliloti* (Figura 7 e 13B). Nestas proteínas, este *linker* (L1) forma uma estrutura do tipo *coiled-coil* entre dois monômeros e mantém as proteínas como dímeros inativos no estado desfosforilado (DOUCLEFF et al, 2005). A análise de seqüência da proteína NtrX de *A. brasilense* no programa Coil (LUPAS, VanDYKE e STOCK, 1991) revelou que na região do *linker* (L1) há uma grande possibilidade de estrutura do tipo *coiled-coil* para NtrX, sugerindo que esta proteína pode formar dímeros devido as interações de aminoácidos presentes na região do *linker* (L1). A interface entre os homodímeros é criada por uma bolsa hidrofóbica, que apresenta o motivo: T/SGxGxhxxxhxxh, onde “h” representa aminoácidos hidrofóbicos (DOUCLEFF et al, 2005; Figura 7). Este motivo é conservado entre as proteínas NtrX, incluindo a de *A. brasilense*. Nas proteínas NtrC1 e DctD, o *linker* (L1) funciona como um regulador negativo, por

manter o dímero desfosforilado estável (LEE et al, 2003; PARK et al, 2002; Figura 12). Na regulação negativa, o domínio N-terminal das EBPs-RRs interagem formando dímeros que estabilizam a forma não oligomérica. A fosforilação deste domínio estabiliza uma outra conformação do dímero que permite a oligomerização. Já na proteína NtrC de *S. typhimurium* não há dimerização na região do domínio N-terminal e quando este é fosforilado, muda de conformação expondo o domínio central para a interação com o fator sigma (Figura 11). Desta forma, este domínio exerce a função de regulação positiva na proteína NtrC de *S. typhimurium* (DOUCLEFF et al, 2005). Na regulação positiva, a fosforilação do domínio N-terminal das EBPs-RRs promove uma mudança conformacional que expõe uma região hidrofóbica deste domínio da proteína que favorece a interação entre as subunidades, facilitando a formação do hexâmero. Os dados estruturais teóricos obtidos para a proteína NtrX de *A. brasilense* sugerem que o domínio N-terminal de NtrX também apresenta efeito regulador negativo sobre o domínio central como observado para as proteínas NtrC1 e DctD. Os motivos estruturais encontrados para a proteína NtrX de *A. brasilense* também foram observados em outras proteínas NtrX (Figura 10).

O modelo estrutural teórico do domínio central da proteína NtrX de *A. brasilense* mostra que NtrX, como as demais proteínas da classe das EBPs apresenta um domínio central AAA+ formado por dois subdomínios: o α/β Rossman e o α -hélice (Figura 13C). Os motivos deste domínio são estruturalmente semelhantes aos das proteínas: NtrC1 de *Aquifex aeolicus*, PspF de *E. coli* e ZraR de *Salmonella typhimurium* (Figura 8 e 13C). Os motivos: Walker A envolvido na ligação a nucleotídeos (revisado por SCHUMACHER et al, 2006); Walker B (hhhDE) onde “h” corresponde a aminoácidos hidrofóbicos e o resíduo de aspartato é importante para hidrólise de ATP, podendo estar envolvido na coordenação do Mg^{+2} ; o motivo GAFTGA localizado na alça 1 que é responsável pela ligação ao fator σ^{54} , provavelmente interagindo com a região 1 deste fator (BORDES et al, 2003); a região Sensora I localizado na alça 2 que contém um resíduo de treonina cuja cadeia lateral está posicionada entre os motivos Walker A e B; a região Sensora II que apresenta uma arginina envolvida no ligação a nucleotídeos na proteína NtrC (ROMBEL et al, 1998), sendo que na PspF é responsável pelo posicionamento do

γ -fosfato do ATP e pode estar envolvida na hidrólise e coordenação do Mg^{+2} e a região SHR (região de homologia secundária) que contém os dois dedos de arginina presentes na maioria das proteínas da família AAA+ (Figura 8). Estas argininas parecem estar envolvidas na catálise intersubunidades já que mutações nesta região afetam atividade de ATPase mas não impedem a ligação a nucleotídeos (ROMBEL et al, 1998; SCHUMACHER et al, 2004). Os resultados destas análises estruturais sugerem que o domínio AAA+ da proteína NtrX de *A. brasilense* pode interagir com σ^{54} e ter função catalítica semelhante as proteínas PspF de *E. coli* e NtrC1 de *A. aeolicus*. Proteínas da família AAA+ que não apresentam o motivo GAFTGA, como a proteína NtrC de *R. capsulatus* e TyrR de *E. coli*, são incapazes de ativar a transcrição de promotores dependentes de σ^{54} mas regulam a atividade de promotores dependentes de σ^{70} (PITTARD e DAVIDSON, 1991).

Na região C-terminal de NtrX de *A. brasilense*, o modelo estrutural teórico calculado contém dois motivos do tipo hélice-volta-hélice (HTH) e alinha-se estruturalmente com as proteínas FiS e ZraR (Figura 9). Uma segunda região de ligação entre domínios é observada nesta região (L2). Este *linker* na proteína NtrX de *A. brasilense* é mais longo que o *linker* (L2) das proteínas NtrC1 e DctD (Figura 12). Na estrutura calculada para NtrX, esta região forma uma hélice (Figura 13D), semelhante as estruturas obtidas para as proteínas FiS e NtrC (Figura 11). Nestas proteínas, esta região é responsável pelo contato entre os dímeros no sítio de ligação ao DNA. As proteínas DctD e NtrC1 não apresentam região de homologia com a hélice de dimerização. Estes resultados sugerem que o domínio C-terminal da proteína NtrX de *A. brasilense* dimeriza como as proteínas FiS e NtrC. O alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas NtrX de *A. brasilense* com as proteínas NtrC de *A. brasilense*, *S. typhimurium* e *E. coli* mostram que a região envolvida na ligação de NtrC ao DNA é a região que corresponde ao segmento mais conservado deste domínio (Figura 11). Além disso, os resíduos R e K envolvidos na interação com o DNA são praticamente idênticos nestas proteínas, sugerindo que a proteína NtrX é capaz de reconhecer o sítio de ligação de NtrC ao DNA (Figura 11).

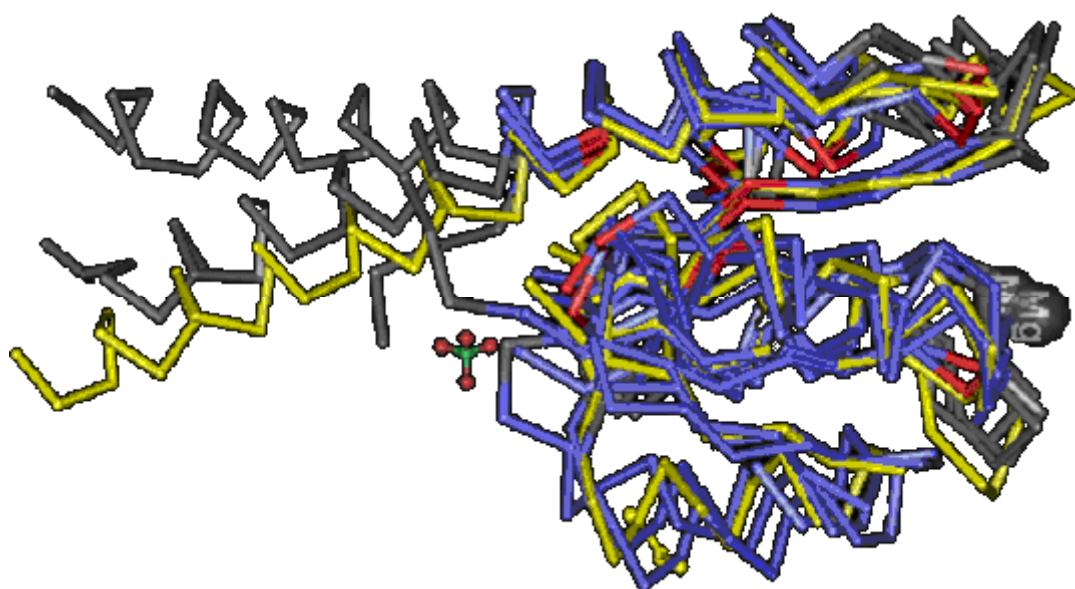
As análises de alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NtrX mostrou similaridade com outras proteínas da família AAA+, sugerindo uma

interação com o fator sigma 54 e atividade catalítica semelhante às proteínas PspF de *E. coli* e NtrC1 de *A. aeoculis*, podendo sugerir que a proteína NtrX de *A. brasilense* pode ter atividade de ativadora transcricional de genes dependentes do fator sigma 54 da RNA polimerase.

Como a proteína NtrX de *A. brasilense* possui características híbridas entre as proteínas NtrC e DctD, uma árvore filogenética foi construída, utilizando o programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) comparando a proteína NtrX de *A. brasilense* com outras proteínas EBPs, EBPs-RRs e RRs. A proteína NtrX de *A. brasilense* está próxima das proteínas EBPs-RRs NtrX e NtrC de *A. caulinodans*, NtrX de *G. diazotrophicus* e *S. meliloti* e das RRs NarL de *E. coli*, FixJ de *A. caulinodans* e *S. meliloti* e NtrX de *H. seropedicae*, devido a alta similaridade dos domínios N-terminal e C-terminal destas proteínas com a proteína NtrX. A proteína DctD de *S. meliloti* está relativamente próxima e as proteínas NtrC estão em outro ramo. (Figura 14).

Figura 7: Alinhamento estrutural das seqüências de aminoácidos do domínio N-terminal da proteína NtrX de *A. brasilense*

A



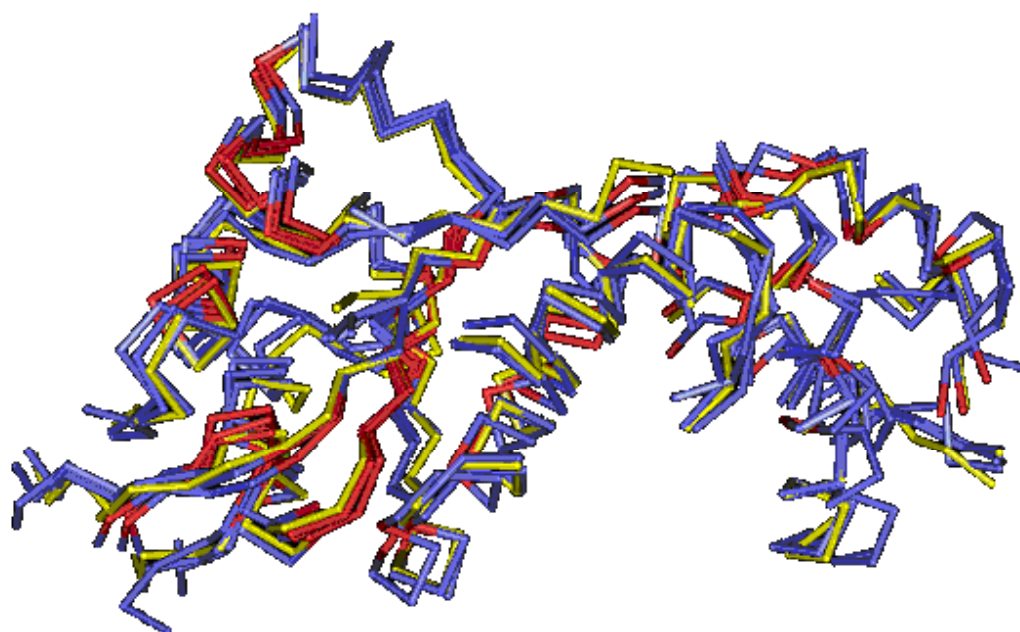
B

		10	20	30	40	50	60	
	******	
<u>VS12</u>	1	HDILIVDDEADIRMLIAGILNDEGMK	TREAADADQAF	QVSARRPSLVVLDI	IWLQGSRLD		60	
<u>1NY5_B</u>	1	MNVLVIEDDKVFRGLLEEYLSMKGIK	VESAERGKEAYKLLSEKHFNVVLLD	LLLP--DVN			58	
<u>1ZY2_A</u>	1	MNVLVIEDDKVFRGLLEEYLSMKGIK	VESAERGKEAYKLLSEKHFNVVLLX	LLLP--DVN			58	
<u>1DCK_B</u>	4	YTVHIVDDEEPVRKSLAFMLTMNGFA	VKMHQSAEAF	LAFAPDVRnGVLVTDLRMP--DMS			61	
<u>1ZIT_A</u>	2	KRVLVVDDEEsiTSSLSAILLEEEGY	HPDTAKTLREAEKKIKELFFPVIVL	DVwmpd--gd			59	
<u>1J56_A</u>	4	GIVVVVDDSSIRWVLERALAGAGLTC	TFENGNEVLAALASKTPDVLLSDI	RMPGm--d			61	
		70	80	90	100	110	120	
	******	
<u>VS12</u>	61	GLQILEQLMRDHRNLRVIMISGHGNI	ETAVSAIKIG----	AYDFIEKPFKADRL	LLMVDR		116	
<u>1NY5_B</u>	59	GLEILKWKIKERSPETEVIVITGHGT	IKTAVEAMKMG----	AYDFLTKPCMLEE	IELTINK		114	
<u>1ZY2_A</u>	59	GLEILKWKIKERSPETEVIVITGHGT	IKTAVEAMKMG----	AYDFLTKPCMLEE	IELTINK		114	
<u>1DCK_B</u>	62	GVELLRNLGDLKiNIPSI	VITGHGDVPM	AVEAMKAG----	AVDFIEKPFEDT	VIIEA	117	
<u>1ZIT_A</u>	60	gVNFIDFIKensPDSVVI	VITGHGSVDT	AVKAIKG----	AYEFLEKPF	SVERFL	115	
<u>1J56_A</u>	62	GLALLKQIKQRHPMLPVIIMTahs	---dlDAAVSAyqqg	AFDYLPKPF	DIDEAVALVER		117	
			Bolsa Hidrofóbica		Linker L1			
			T/SGxGxhxxxxhxxh					
		130	140					
	***				
<u>VS12</u>	117	AIEEARLKRENEELKLRAGGEV					138	
<u>1NY5_B</u>	115	AIEHRKLRKENELLRREKDLKE					136	
<u>1ZY2_A</u>	115	AIEHRKLRkenellrrekdlke					136	
<u>1DCK_B</u>	118	ASEHLvale-----					126	
<u>1ZIT_A</u>	116	AFEYS-----					121	
<u>1J56_A</u>	118	AISHYQe-----					124	
			Linker L1					

Alinhamento estrutural teórico do domínio N-terminal da proteína NtrX de *A. brasilense*. **(A)** Alinhamento do modelo teórico do domínio N-terminal das proteínas NtrX de *A. brasilense* (amarelo) com os modelos estruturais da proteínas: NtrC1 de *Aquifex aeolicus* (1NY5) e NtrC1 domínio N-terminal de *Aquifex aeolicus* (1ZY2), FixJ de *S. meliloti* (1DCK). **(B)** Alinhamentos das seqüências de aminoácidos das proteínas NtrX de *A. brasilense* (VS12), NtrC1 de *Aquifex aeolicus* (1NY5), NtrC1 domínio N-terminal de *Aquifex aeolicus* (1ZY2), FixJ de *S. meliloti* (1DCK) e NtrC4 de *Aquifex aeolicus* (1ZIT) e NtrC de *S. typhimurium* (1J56). Os aminoácidos em vermelho são idênticos entre as seqüências. Indicado a presença da bolsa hidrofóbica e a hélice do *linker 1* (de K108 até G140).

Figura 8: Alinhamento estrutural das seqüências de aminoácidos do domínio central da proteína NtrX de *A. brasilense*

A



B

```

          10          20          30          40          50          60
VS12      1  LIGRSTPSTTIYRVLARL--MG--TDLTITGESGTGKELVARALHDYGKRRNGPFVAINM 56
1NY5_B   139 YVFESPKMKEILEKIKKIsc--aeCPVLITGESGVGKEVVARLIHKLSDRSKEPFVALNV 196
1OJL_D   4  MIGSSPAMQHLLNEIAMV--APsdATVLIHGDSGTGKELVARALHACSARSrDRPLVTLNC 61
2C98_A   8  LLGEANSFLEVLEQVSHLapLD--KPVLIIGERGTGKELIASRLHYLSSRWQGPFIrSLNC 65
                                     WALKER A

          70          80          90          100         110         120
VS12      57  AAIPRELIESELFGHEKGAFTGATNRSTGRFEQAQGGTLFLDEIGDMPLEAQTRLLRVLQ 116
1NY5_B   197 ASIPRDIFEAELFGYEKGAFTGAVSSKEGFFELADGGTLFLDEIGELSLEAQAKLLRVIE 256
1OJL_D   62  AALNESLLESELFGHEKGAFTGADKRREGRFVEADGGTLFLDEIGDISPLMQVRLLRAIQ 121
2C98_A   66  AALNENLLDSELFGHEAgaftgaQKRHGRFERADGGTLFLDELATAPMMVQEKLLRVIE 125
                                     ALÇA 1                                     WALKER B

          130         140         150         160         170         180
VS12     117  EGEYTTVGGRTPIKTDVRIVAATHRDLQAEIDQGRFRQDLFYRLAVVPIRVPSl-RRRED 175
1NY5_B   257  SGKFYRLGGRKEIEVNVRILAATNRNIKELVKEGKFREDLYRLGVIEIEIPPlrERKED 316
1OJL_D   122  EREVQRVGSNQTISVDVRLIAATHRDLAEEVSAGRFRQDLYRLNVVAIEMPSlrQRRED 181
2C98_A   126  YGELErvggSQPLQVNVRLVCATNADLPAMVNEGTFRADLLDLRLAFDVVQLPPlrERESD 185
                                     ALÇA 2                                     SI
                                     _____ SRH _____

          190         200         210         220         230         240
VS12     176  IPLLARHFITLGEAPVC---RPGVGEDAMAALQAYDWPGNVRQLRNVVDWLLIMAQGDPK 232
1NY5_B   317  IIPLANHFLKKFSRKYAk-eVEGFTKSAQELLLSYPWYGNVRELKNVIERAVLFSEG--- 372
1OJL_D   182  IPLLADHFLRFAERNRk-vVKGFTPQAMDLLIHYDWPGNIRELENAIERAVLLTG--- 237
2C98_A   186  IMLMAEYFAIQMCREIklplfpGFTERARETLLNYRWPGNIRELKNVERSVYRHGTSDY 245
                                     SII

          250
VS12     233  EPIRADQLPPEI 244
1NY5_B   373  KFIDRGELSCLV 384
1OJL_D   238  EYISERELPLAi 249
2C98_A   246  ---PLDDIIdp 254

```

Alinhamento estrutural das seqüências de aminoácidos do domínio central da proteína NtrX de *A. brasilense*. **(A)** Alinhamento do modelo teórico do domínio central das proteínas NtrX de *A. brasilense* (amarelo) com os modelos estruturais da proteínas: NtrC1 de *Aquifex aeolicus*, ZraR de *Salmonella typhimurium* e PspF de *E. coli*. **(B)** Alinhamentos das seqüências de aminoácidos das proteínas NtrX de *A. brasilense* (VS12), NtrC1 de *Aquifex aeolicus* (1NY5), ZraR de *Salmonella typhimurium* (1OJL) e PspF de *E. coli* (2C98). Os aminoácidos em vermelho são idênticos entre as seqüências. Indicados os motivos funcionais do domínio AAA+.

Figura 9: Alinhamento estrutural das seqüências de aminoácidos do domínio C-terminal da proteína NtrX de *A. brasilense*

A



B

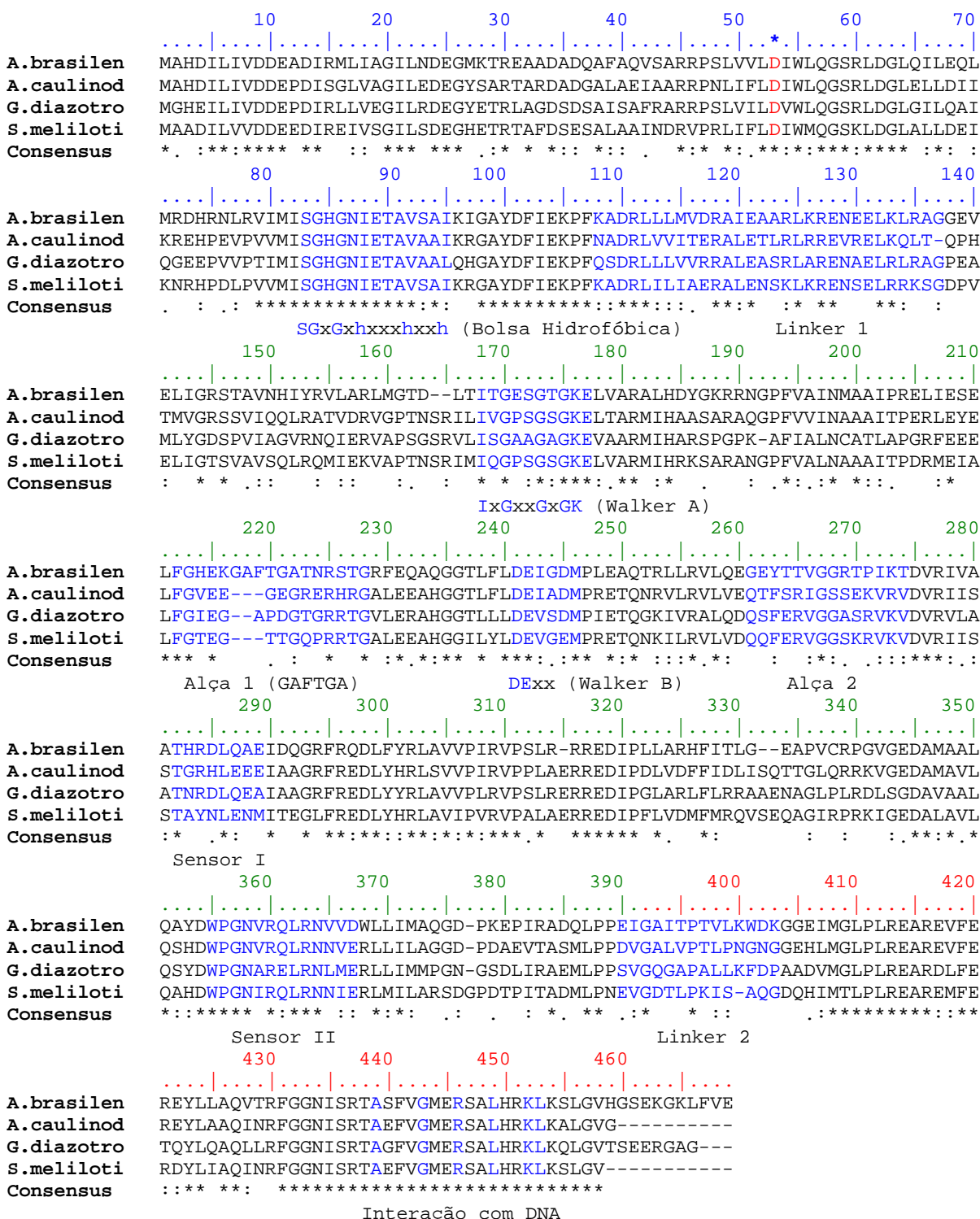
```

          10      20      30      40      50      60
      .....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
VS12      1 PEIGAITPTVLKWD--KGGEIMGLPLREAREVFEREYLLAQVTRFGGNI SRTASFGMER 58
1ETO_B   26 PLRDSVKQALKNYFaQLNGQDVNDLYELVLAEVEQPLLDMMVMQYtlgnQTRALMMGINR 85
1OJL_D  236 tgeyisereplaiiaatpikteysgeiQPLVDVEKEVILAALEKTGGNKTEAARQLGITR 295
          Linker 2

          70
      .....*.....|.....
VS12      59 SALHRKLSLGVH 71
1ETO_B   86 GTLRKCLKKYGMN 98
1OJL_D  296 KTL LAKLSr---- 304
  
```

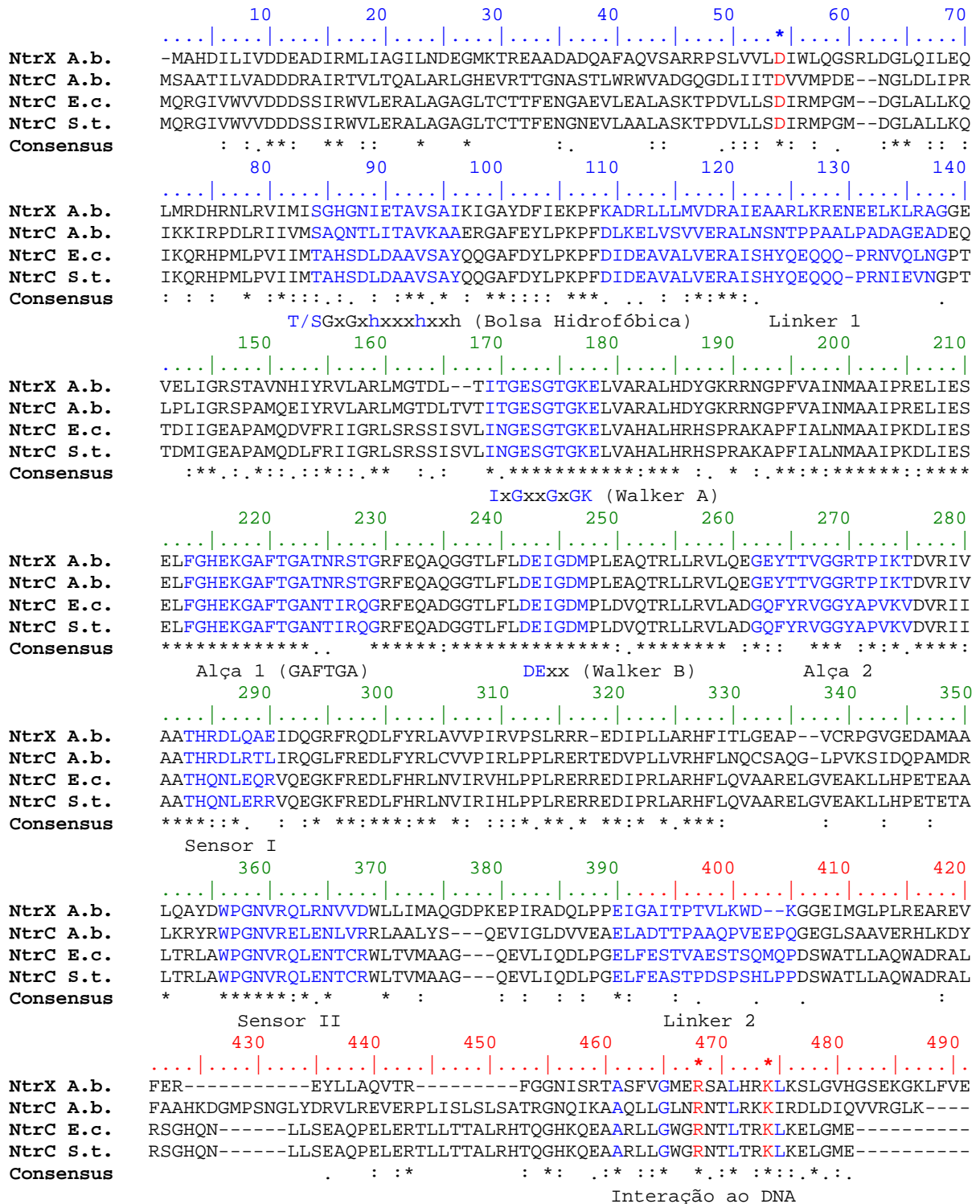
Alinhamento estrutural das seqüências de aminoácidos do domínio C-terminal da proteína NtrX de *A. brasilense*. **(A)** Alinhamento do modelo estrutural teórico do domínio C-terminal das proteínas NtrX de *A. brasilense* (amarelo) com os modelos estruturais da proteínas: Fis de *E. coli* e ZraR de *Salmonella typhimurium*. **(B)** Alinhamentos das seqüências de aminoácidos das proteínas NtrX de *A. brasilense* (VS12) com os modelos estruturais das proteínas Fis de *E. coli* (1ETO) e ZraR de *Salmonella typhimurium* (1OJL). Indicado a presença do *linker 2* na proteína NtrX e os aminoácidos envolvidos na interação com o DNA estão em vermelho.

Figura 10: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NtrX de *A. brasilense* com outras proteínas NtrX (Clustal W - THOMPSON et al, 1994).



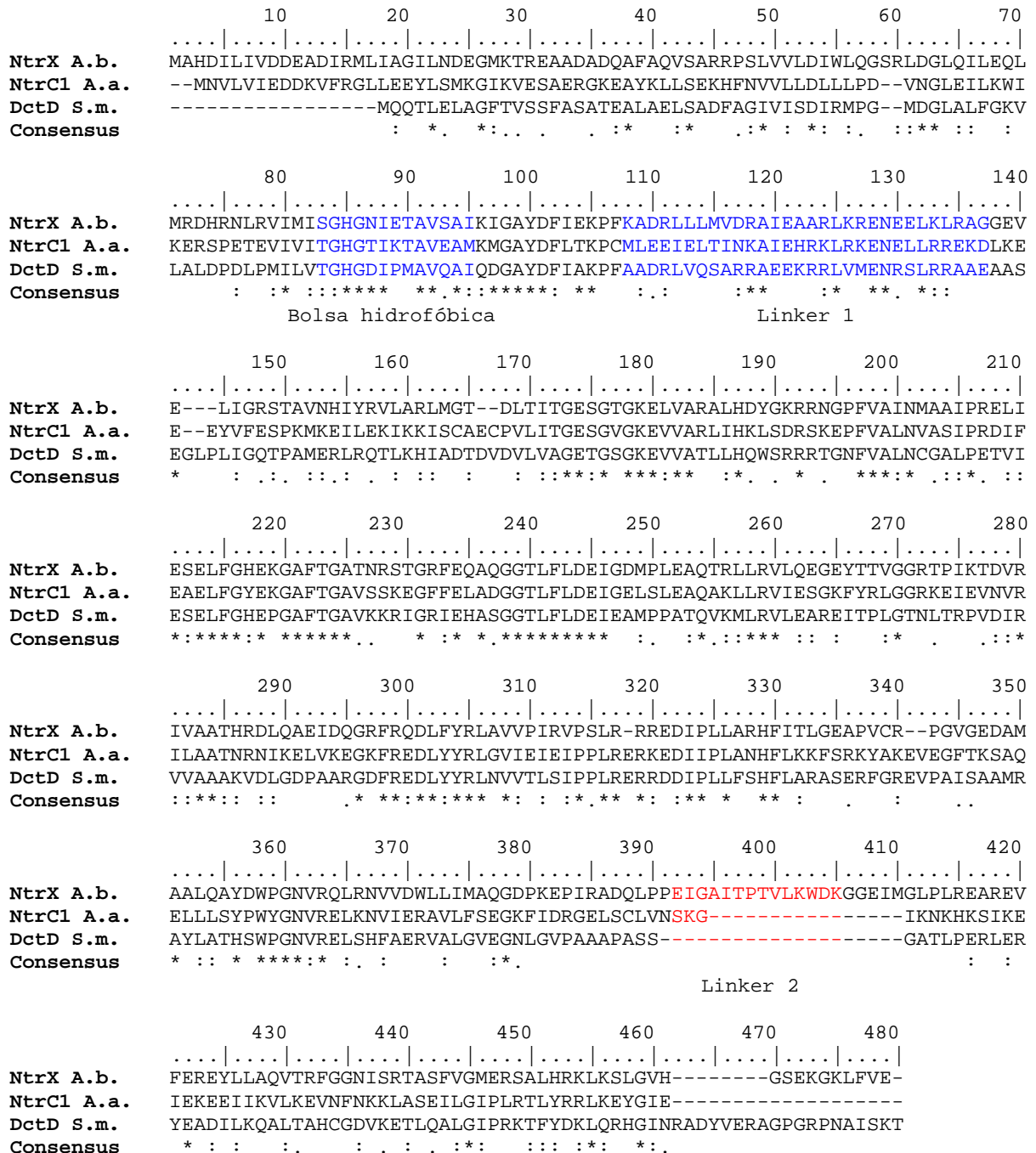
Os números em azul mostram a região N-terminal, em verde a região central e em vermelho a região C-terminal. Indicados os motivos funcionais e os *linker* na região N-terminal e C-terminal. O resíduo D em vermelho mostra o sítio de fosforilação. A similaridade entre as proteínas NtrX é de 70% e a identidade é de 42%.

Figura 11: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NtrX de *A. brasilense* com as proteínas NtrC de *A. brasilense*, *E. coli* e *S. typhimurium* (Clustal W - THOMPSON et al, 1994).



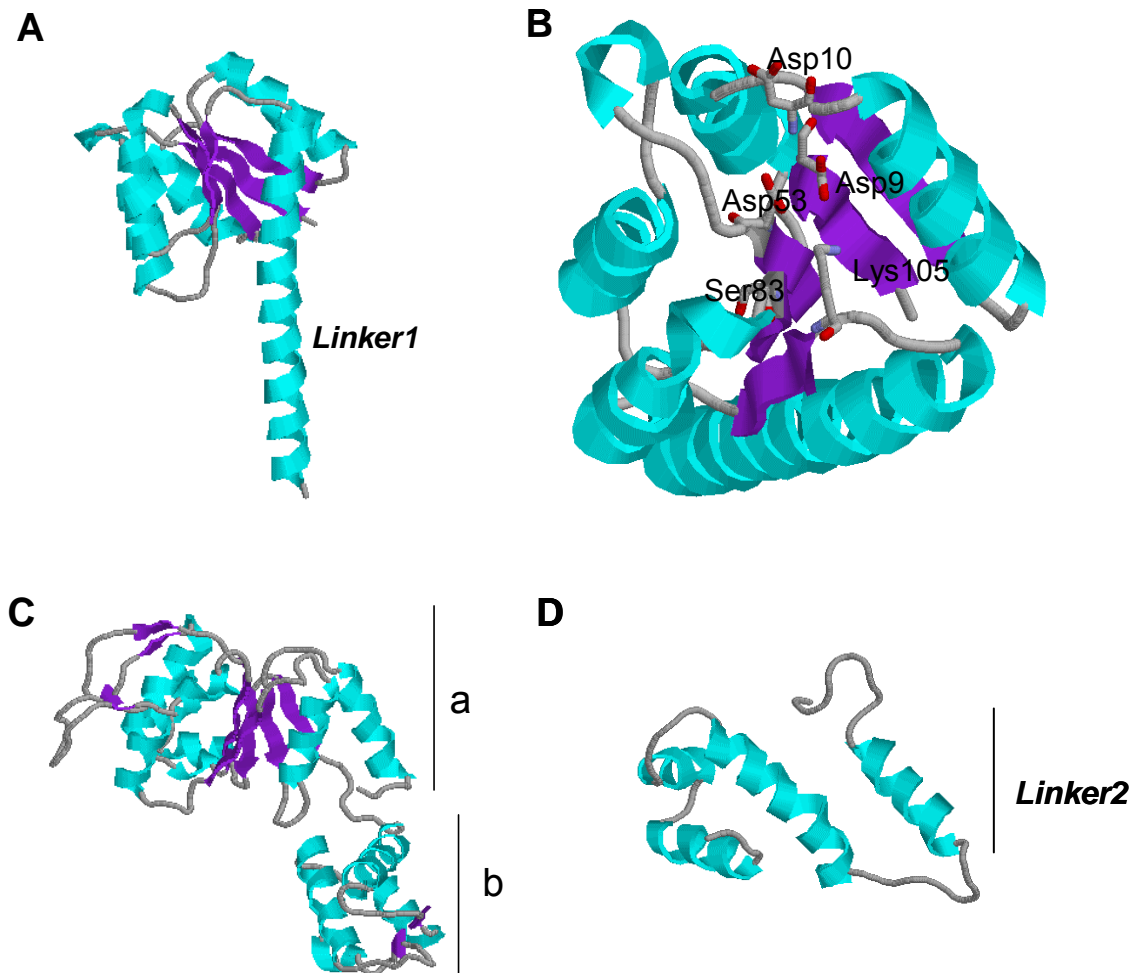
Os números em azul mostram a região N-terminal, em verde a região central e em vermelho a região C-terminal. Indicados os motivos funcionais e os *linker* na região N-terminal e C-terminal. O resíduo D em vermelho mostra o sítio de fosforilação. Os resíduos R e K em vermelho são os resíduos que provavelmente interagem com o DNA. A similaridade entre as proteínas NtrX é de 61% e a identidade é de 33%.

Figura 12: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NtrX de *A. brasilense* com as proteínas NtrC1 de *A. aeolicus* e DctD de *S. meliloti* (Clustal W - THOMPSON et al, 1994).



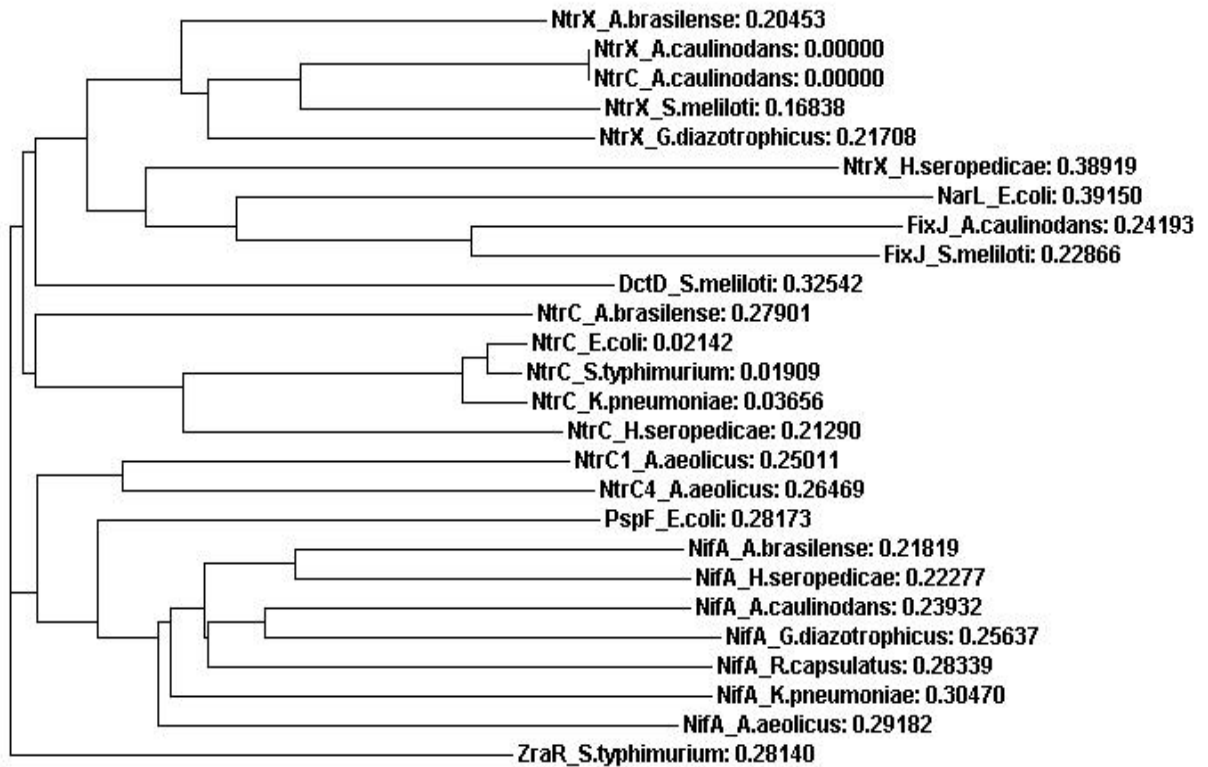
Em azul está destacada a região da bolsa hidrofóbica e do *linker 1*, apresentando alta homologia e em vermelho a região do *linker 2*, ausente nas proteínas NtrC 1 de *A. aeolicus* e DctD de *S. meliloti*.

Figura 13: Modelo estrutural calculado para os domínios funcionais da proteína NtrX de *Azospirillum brasilense*



Modelo estrutural teórico dos domínios funcionais da proteína NtrX. (A): região N-terminal da proteína NtrX, domínio regulatório, contendo o *linker* 1; (B): estrutura do sítios de fosforilação do domínio regulatório da proteína NtrX de *A. brasilense*; (C): região central da proteína NtrX, domínio AAA+ , a) subdomínio α/β Rossman e b) subdomínio α -hélice; e (D): domínio C-terminal, contendo o *linker* 2 e o motivo hélice-volta-hélice.

Figura 14: Árvore filogenética das proteínas que apresentam similaridade de seqüência de aminoácidos com a proteína NtrX de *A. brasilense*



Programa: Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

4.2 – Clonagem do gene *ntrX* N-truncado no vetor de expressão pET29a+

Os plasmídeos pMCA1 e pET29a+ foram digeridos como descrito no item 3.6.1. Os fragmentos de 1,4 kb do plasmídeo pMCA1 e o fragmento de 5,3 kb do pET29a+ foram ligados e transformados em *E. coli* DH10B (Figura 6). O DNA plasmidial das colônias originadas da transformação foi extraído e o plasmídeo que continham um tamanho molecular maior que o controle pET29a+ foram separados e analisados por restrição e seqüenciamento de DNA para confirmação da eficiência da clonagem.

O plasmídeo, contendo o inserto de 1,4kb, foi denominado pETM-x1 e foi utilizado para obtenção da proteína NtrX N-truncada fusionada com a cauda S.Tag na extremidade N-terminal.

Nesta construção foi deletada a seqüência codificadora para oito resíduos de aminoácidos iniciais e uma S.Tag foi fusionada a região N-terminal da proteína (Figura 6). Esta região não possui aminoácidos de motivos funcionais importantes para a função da proteína (Figura 10).

4.3 – Indução da superexpressão da proteína NtrX S.Tag N-truncada

O plasmídeo pETM-x1, que contém o gene *ntrX* N-truncado de *A. brasilense* expresso a partir do promotor do fago T7 e sob o controle do operon *lac*, foi introduzido nas estirpes de *E. coli* BL21λ (DE3) codonplus, RosettaBlue (DE3) pLysS, C41 (DE3) e C43 (DE3) por eletroporação. As células foram cultivadas para indução da proteína NtrX N-truncada como descrito no item 3.6.2.

As células foram coletadas por centrifugação e lisadas na presença de diferentes tampões (item 3.6.5). O perfil eletroforético mostrou a expressão de uma proteína com aproximadamente 54 kDa, que corresponde ao tamanho estimado para a proteína NtrX S.Tag N-truncada de *A. brasilense* com a fusão da cauda S.Tag na região N-terminal. Entretanto, a solubilidade desta proteína foi em média 10% em todos os sistemas testados (Figura 15). Quando a proteína NtrX S.Tag N-truncada foi expressa na estirpe de *E. coli* BL21AI, utilizando L-arabinose como indutor, em média 50% da proteína NtrX S.Tag N-truncada estava na fração solúvel. Assim, o sistema de expressão em BL21AI foi escolhido para expressar a proteína NtrX S.Tag N-truncada (Figura 16). A indução em larga escala foi realizada em 0,2% de L-

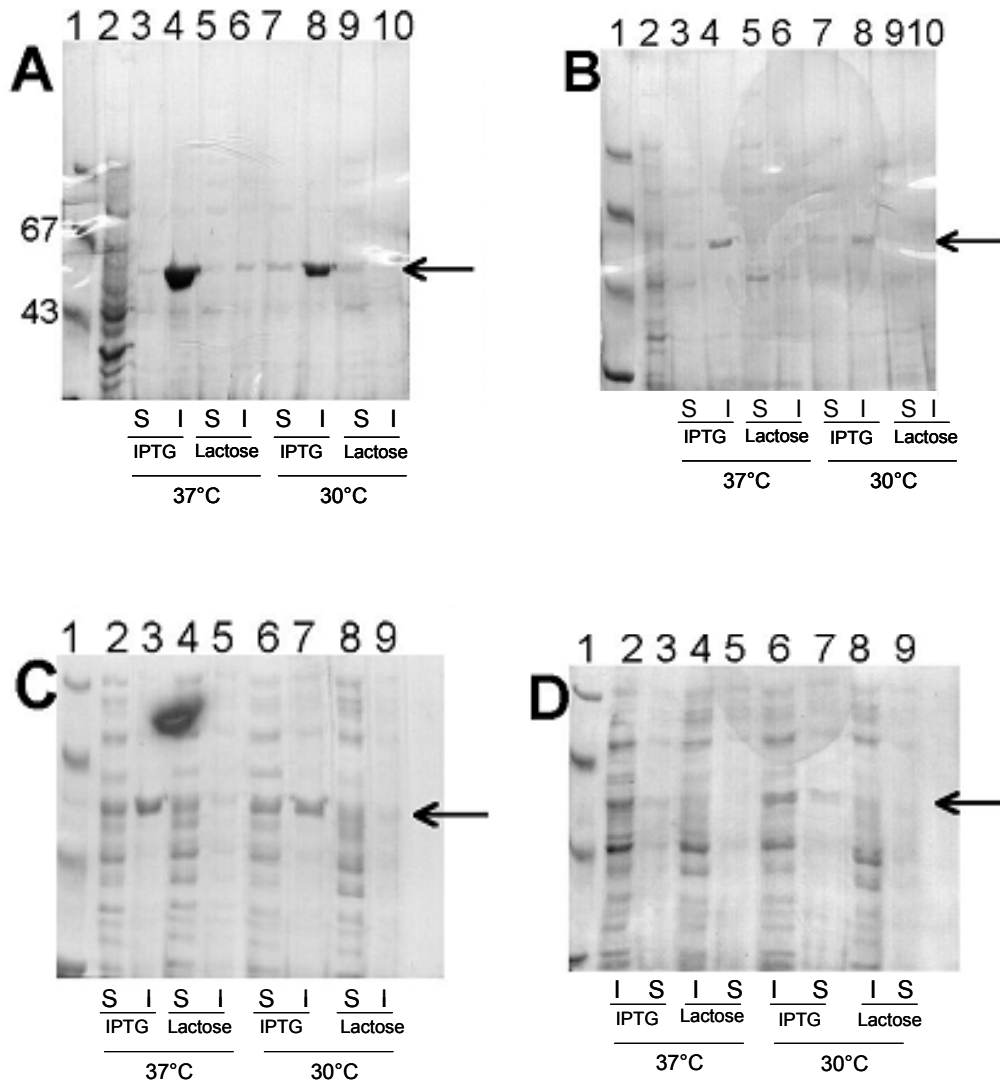
arabinose para evitar a agregação da proteína NtrX superexpressa em maiores concentrações de L-arabinose.

O aumento da solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada, expressa a partir da estirpe de *E. coli* BL21AI, pode estar relacionada com a baixa taxa de indução ou menor velocidade de expressão da proteína durante as fases iniciais de crescimento da bactéria, diminuindo a agregação entre as proteínas ou diminuindo a possibilidade de ocorrerem erros no enovelamento da proteína. Considerando que esta estirpe contém uma inserção cromossomal do gene que codifica a T7 RNA polimerase (T7 RNA-P) interrompendo o gene *araB* no operon *araBAD*, a expressão de T7 RNA-P está sob controle do promotor do operon *araBAD*. Usando um vetor de expressão do tipo promotor T7, como, por exemplo, o vetor pET29a+, a expressão da proteína pode ser controlada pela variação da concentração de L-arabinose no meio. Esta estirpe de *E. coli* é descrita como útil na expressão de proteínas tóxicas para esta bactéria, devido ao eficiente controle dos níveis de expressão de proteínas a partir do promotor T7. Os resultados obtidos com a expressão da proteína NtrX S.Tag N-truncada sugerem que esta estirpe pode ser usada como uma alternativa para expressar proteínas pouco solúveis.

Para avaliar o efeito do ditioneitol (DTT) na solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada, as células de *E. coli* BL21AI, contendo o plasmídeo pETM-x1, foram cultivadas em meio LB sob condições de indução da proteína NtrX S.Tag N-truncada, previamente descrito. Estas células foram lisadas na presença dos tampões 2 e 2A (item 3.6.5).

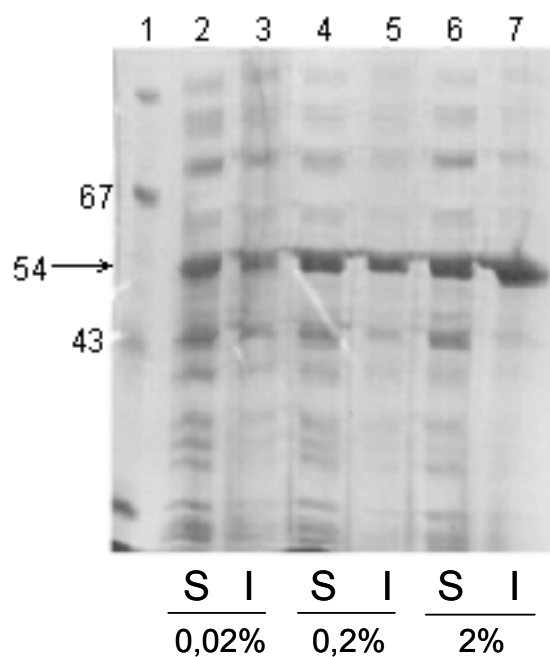
As amostras foram aplicadas em um gel de SDS-PAGE 12% (Figura 17), e observou-se que a presença de DTT no tampão de lise não interfere na solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada. Desta forma, o tampão de escolha para a lise celular foi o tampão 2 A. Os demais tampões utilizados para as etapas de purificação da proteína também foram preparados sem o DTT. O DTT é usado para reduzir ligações dissulfeto e manter os monômeros no estado reduzido, estabilizando a proteína. A presença deste composto no tampão da proteína poderia exercer um efeito inibitório das propriedades de oligomerização da proteína, influenciando negativamente os ensaios de caracterização desta proteína.

Figura 15: Solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada de *A. brasilense* superexpressa em diferentes estirpes de *E. coli*



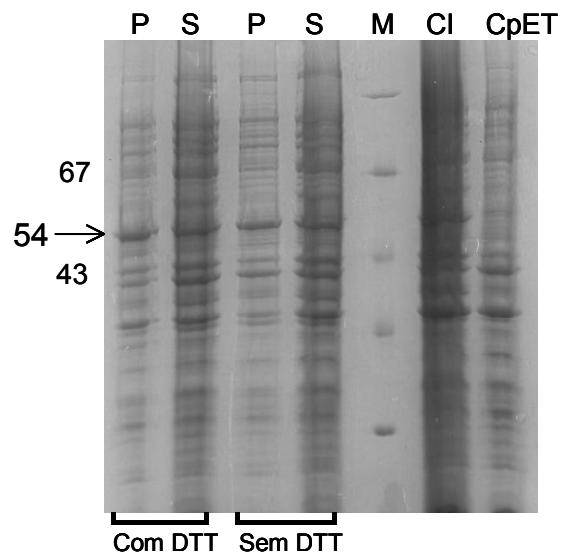
Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% dos extratos celulares das estirpes de *E. coli* BL21 λ (DE3) codonplus, RosettaBlue (DE3) pLysS, C41 (DE3) e C43 (DE3) expressando a proteína NtrX N-truncada em tampão 2. Indicadas as frações solúveis e insolúveis de cada sistema de indução, bem como o agente indutor e a temperatura utilizada.

Figura 16: Solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada superexpressa em *E. coli* BL21AI



Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% dos extratos celulares das estirpes de *E.coli* BL21AI expressando a proteína NtrX S.Tag N-truncada induzida com diferentes concentrações de L-arabinose em tampão 2. Indicadas as frações solúveis e insolúveis de cada sistema de indução.

Figura 17: Efeito do DTT na solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada



Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% dos extratos celulares das estirpes de *E.coli* BL21AI expressando a proteína NtrX S.Tag N-truncada. As células foram lisadas em tampão com e sem DTT (item 3.6.5). Linhas (P): frações insolúveis e linhas (S): frações solúveis, contendo ou não DTT nos tampões de sonicação, como indicado abaixo da figura. Linhas (M): marcador de massa molecular, (CI): extrato bruto da indução e (CpET): controle negativo, indução apenas com o vetor pET29a+.

4.4 – Purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada

Após a indução de 2 L de meio de cultura, as células foram coletadas, ressuspensas em aproximadamente 10 mL de tampão de lise 2A e sonicadas. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado e diluído com 40 mL de tampão A para diminuir a quantidade de glicerol (50%) e NaCl (500 mmol/L) presentes no tampão de lise. A presença de 50% de glicerol e alta concentração de NaCl no tampão de lise foram essenciais para aumentar a solubilidade da proteína. Em seguida, a proteína foi purificada por cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose, e uma alíquota de cada fração foi aplicada em gel de SDS-PAGE 12% para a visualização do perfil de eluição da proteína NtrX S.Tag N-truncada. Nesta etapa cromatográfica houve redução da quantidade de contaminantes, com uma pureza de 28,7% (Tabela 2).

As frações com perfil semelhante foram agrupadas, dialisadas na presença de tampão A e aplicadas na coluna Agarose-Heparina. Após esta etapa cromatográfica, as frações que continham a proteína NtrX S.Tag N-truncada mais pura foram concentradas por membrana de polietersulfona Vivaspín 6 (Vivascience) e dialisadas na presença de tampão A. A pureza obtida nestas frações foi de 75,8% (Tabela 2) e a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em Agarose-S.Tag, utilizando o kit de purificação de proteínas fusionadas com cauda S.Tag (Novagen). Após esta etapa cromatográfica, a proteína NtrX S.tag N-truncada apresentou 90% de pureza (Tabela 2). Em seguida, a proteína foi dializada em tampão A contendo 50% de glicerol (Figura 18) e estocada a -20°C . Esta fração foi utilizada nos experimentos de caracterização desta proteína.

O baixo rendimento da purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada (Tabela 2) pode ser explicado pela baixa solubilidade da proteína ou pela própria característica estrutural da proteína, de interação com o DNA, oligomerização, que diminuem a concentração de proteína, e outras proteínas, que dificultam a remoção de contaminantes. Além disso, a proteína NtrX S.Tag N-truncada apresentou baixa eficiência de ligação da cauda S.Tag da proteína à S.Tag Agarose, mesmo seguindo as orientações do fabricante, resultando em grande perda da proteína na fração de ligação e lavagens.

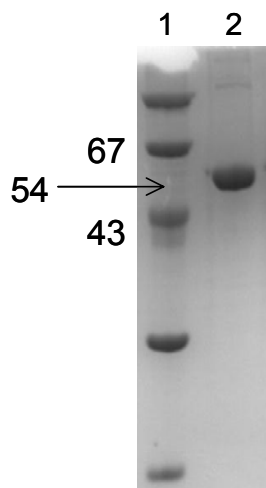
A proteína NtrC de *E. coli* expressa a partir de seu próprio promotor foi purificada usando colunas de fosfocelulose e DNA-agarose (REITZER e

MAGASANIK, 1983). A proteína NtrC de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhimurium* superexpressas a partir de um promotor T7 promoter foram purificadas na forma solúvel usando colunas de afinidade ou heparina (MOORE et al, 1993; HAWKES et al, 1985; KLOSE et al 1994). Ainda, a proteína NtrC de *S. typhimurium* fusionada a uma proteína ligadora de maltose (MBP-NtrC) foi purificada com alto rendimento e tendo atividade de ATPase e fosforilação similar aquelas proteínas NtrC nativas (REITZER e MAGASANIK, 1983). A proteína NtrC1 de *Aquifex aeolicus* foi também purificada na forma solúvel (LEE et al, 2003). Em contraste com esses resultados, a proteína NtrC de *Herbaspirillum seropedicae* fusionada a uma cauda His não era solúvel quando superexpressa em *E. coli* a partir de um promotor T7. Para a purificação, esta proteína foi solubilizada com N-lauril-sarcosina e a atividade de ligação ao DNA foi recuperada após a remoção deste detergente (TWERDOCHLIB et al, 2003). Como a proteína NtrX superexpressa estava parcialmente solúvel, nós escolhemos purificar esta proteína na sua forma nativa, ao invés de usar condições de solubilização mais severos, mesmo com um baixo rendimento final.

Tabela 2: Passos de purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada expressa em *E. coli* estirpe BL21A1

Fração	Proteínas Totais (mg)	Pureza (%)	Rendimento (%)
Fração Solúvel	77,5	-	100
Q-Sepharose	21,4	28,7	27,61
Heparina	2,04	75,8	2,63
S.Tag Kit	0,72	90	0,93

Figura 18: Perfil da proteína NtrX S.Tag N-truncada após as diferentes etapas cromatográficas



Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% após todos os passos de purificação da proteína NtrX S.Tag N-truncada. Linha 1: marcador de massa molecular, linha 2: a proteína NtrX S.Tag N-truncada após a última etapa de purificação. A amostra de proteína foi concentrada 10x em membrana de polietersulfona (Vivascience) e dialisada em tampão contendo 50% de glicerol.

4.5 – Análise da proteína NtrX S.Tag N-truncada por espectrometria de massa tipo MALDI-ToF/MS

Após a preparação da amostra com a matriz HCCA e fixação no suporte metálico do espectrômetro, foi obtido um espectro dos peptídeos da proteína NtrX S.Tag N-truncada pelos programas Flex Control e Flex Analysis (Bruker Daltonics). Estes picos foram comparados com o perfil espectrométrico teórico da proteína NtrX N-truncada, produzido pelo programa MS-Digest (Protein Prospector) a partir da seqüência de aminoácidos da proteína desta proteína.

O resultado da comparação entre o espectro teórico e o experimental mostrou homologia entre 7 picos de identificação de peptídeos, expressos em valores de massas moleculares (Da) (Tabela 3). Desta forma, podemos afirmar que a banda

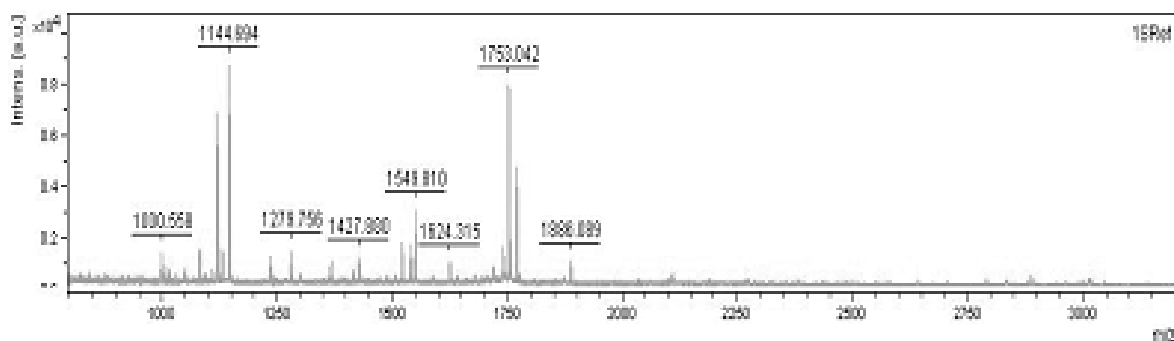
que está sendo purificada corresponde à proteína NtrX S.Tag N-truncada. O cromatograma obtido na análise está representado na figura 19.

Tabela 3: Valores das massas moleculares dos peptídeos detectados pelo espectrômetro de massa tipo MALDI-ToF/MS

Valores Experimentais (Da)	Valores Teóricos (Da)	Valores Experimentais (Da)	Valores Teóricos (Da)
1000.558	1000.5422	1537.836	-
1082.695	1082.6317	1539.959	-
1119.636	-	1549.810	1549.7241
1130.671	-	1624.315	-
1144.694	-	1718.115	-
1279.756	-	1739.075	1738.9963
1367.843	-	1753.042	1752.9279
1427.880	1427.7569	1770.052	1769.9221
1520.009	-	1886.089	-

A identificação de peptídeos experimentais que não conferem com os peptídeos teóricos deve-se ao fato de que a digestão triptica pode não ter sido total ou a identificação de peptídeos da própria tripsina ou de contaminantes externos a amostra, como a queratina proveniente da pele.

Figura 19: Cromatograma dos peptídeos produzidos por digestão triptica da proteína NtrX S.Tag N-truncada identificados pelo espectrômetro de massa tipo MALDI-ToF/MS



4.6 – Determinação da atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada

A reação de hidrólise de ATP mediada pela proteína NtrX S.Tag N-truncada é visualizada pela oxidação do NADH acompanhada pela diminuição do valor de absorvância do sistema de reação a 340nm, comprimento de onda referente ao pico máximo de absorção de luz pelo NADH.

A proteína NtrC de *E. coli* foi usada como controle positivo da reação por apresentar uma atividade de ATPase bem caracterizada (WEISS et al, 1991; AUSTIN e DIXON, 1992; WIDDICK et al, 1998). O controle negativo da reação foi feito com ausência da proteína NtrX N-truncada.

A atividade de ATPase da proteína NtrX foi testada na presença de plasmídeos contendo regiões promotoras tipo sigma 54, incluindo a seqüência de ligação da proteína NtrC (UAS-NtrC) (Figura 21) e sigma 70 (Figura 22), e na presença de carbamil-fosfato.

Os resultados da atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada estão representados na figura 20, expressa em número de mol/L de ATP hidrolisados por minuto.

A proteína NtrX S.Tag N-truncada foi capaz de hidrolisar o ATP a ADP de maneira dependente da concentração de proteína (Figura 20), sugerindo que a estirpe de *E. coli* BL21AI expressou a proteína NtrX S.Tag N-truncada na forma solúvel e ativa. Além disso, a atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada de *A. brasilense* foi similar a NtrC de *E. coli* (WIDDICK et al, 1998).

A proteína NtrC ativa o promotor dos genes *glnBA* de *A. brasilense*, provavelmente por ligação à região NtrC-UAS localizada a montante do promotor do tipo σ -54 (HUERGO et al, 2003). A ligação da proteína NtrC à seqüência UAS estimula a atividade de ATPase, um efeito realçado pela fosforilação (WIDDICK et al, 1998). Considerando os indícios de que a proteína NtrX pode substituir a proteína NtrC (VITORINO et al, 2001; DREPPER et al, 2006), a atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada foi avaliada na presença do plasmídeo pLHglnBTZ, que contém a região promotora dos genes *glnBA* (Figura 21) e na presença de carbamil-fosfato, doador de fosfato para a proteína.

Adicionando o plasmídeo contendo o promotor de *glnBA* (σ -54 dependente incluindo a região NtrC UAS; Figura 21), a atividade de ATPase das proteínas NtrX S.Tag N-truncada e NtrC aumentaram significativamente ($p < 0,05$), no entanto, a

adição do plasmídeo contendo o promotor do operon *ntrYX* (σ -70 dependente) não alterou a atividade de ATPase ($p < 0,05$). A adição de carbamil-fosfato no sistema também aumentou a atividade de ATPase das proteínas NtrX S.Tag N-truncada e NtrC significativamente ($p < 0,05$). Além disso, quando foram adicionados carbamil-fosfato e DNA plasmidial contendo o promotor σ -54 dependente e NtrC-UAS, a atividade de ATPase aumentou significativamente ($p < 0,05$). O perfil de atividade de ATPase foi similar àquelas da proteína NtrC de *E. coli* e *K. pneumoniae*, onde a fosforilação e adição de DNA contendo a região NtrC-UAS apresentam um efeito sinérgico (WIDDICK et al, 1998; YANG et al, 2004). Esses resultados sugerem que a seqüência presente na região promotora dos genes *glnBA* é capaz de realçar a atividade de NtrX S.Tag N-truncada, um efeito similar àquele observado para a proteína NtrC de *E. coli* (WIDDICK et al, 1998; YANG et al, 2004). Os resultados *in vitro* da atividade de ATPase mostram que a proteína NtrX de *A. brasilense* apresenta atividade semelhante a NtrC de *E. coli*, sugerindo que a resposta biológica produzida via sistema NtrBC e NtrYX também podem ser semelhantes.

Possivelmente, a presença de carbamil-fosfato e do promotor tipo sigma 54 possam estar favorecendo a formação do oligômero da proteína NtrX S.Tag, causando o aumento da atividade de ATPase desta proteína, bem como da proteína NtrC de *E. coli*.

As análises *in silico* das proteínas NtrY e NtrX sugerem que elas constituem um sistema de dois componentes similar a NtrBC, também envolvido no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio.

A proteína NtrY é o componente sensor, e análises usando o programa SMART (SCHULTZ et al, 1998) mostram que o domínio N-terminal contém quatro regiões transmembrana. A região central contém dois domínios: o domínio HAMP, presente em várias proteínas sensoras transmembrana histidina quinase e fosfatase e PFAM-PAS, um domínio de interação com fatores de sinalização; o domínio HisKA, que é o domínio fosforeceptor. A região C-terminal contém um domínio HATPaseC, responsável pela ligação ao ATP. Em contraste, a proteína NtrB não possui região transmembrana, mas contém um domínio sensor PAS seguido dos domínios HisKA e HATPaseC.

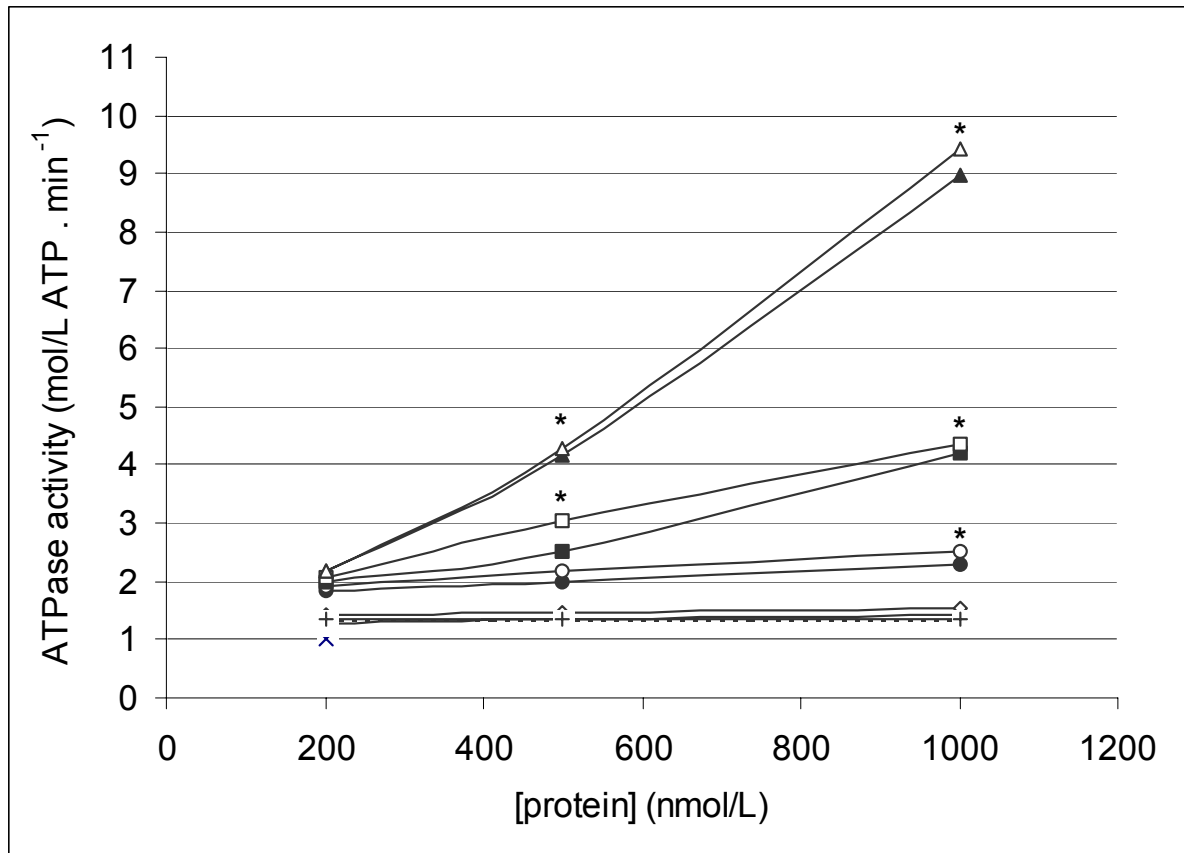
A estrutura dos domínios da proteína NtrX é bastante similar à proteína NtrC. Ambas são “enhancer binding proteins” reguladoras de resposta (EBPs-RRs), que

contém um domínio sensor N-terminal (REC), um domínio central catalítico (AAA+) e um domínio de ligação ao DNA C-terminal (HTH).

O fato de que a grande diferença entre os sistemas NtrBC e NtrYX está na proteína sensora, sendo NtrB é uma sinalizadora intracelular e NtrY uma provável sinalizadora extracelular, sugere que possa existir uma intercomunicação entre esses sistemas. Em *Rhodobacter capsulatus* a proteína NtrY é capaz de fosforilar a proteína NtrC, revelando uma intercomunicação entre os dois sistemas regulatórios (DREPPER et al, 2006).

Análises estruturais dos domínios sugerem que as maiores diferenças entre esses sistemas estão na proteína sensora, onde a proteína NtrY é transmembrana e provavelmente está envolvida na sinalização extracelular de níveis de nitrogênio, enquanto que a proteína NtrB é sensora de níveis intracelulares, interagindo com a proteína GlnB. Juntos esses resultados sugerem que pode haver uma intercomunicação entre os sistemas NtrBC e NtrYX em *A. brasilense* como observado em *R. capsulatus*.

Figura 20: Gráfico da atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada



Atividade de ATPase da proteína NtrX N-truncada. Os símbolos são: (losango aberto) somente a proteína NtrC; (losango fechado) somente a proteína NtrX N-truncada; (cruz com linha tracejada) proteína NtrC com adição de 10 nmol/L de DNA plasmídeo contendo o promotor σ^{70} dos genes *ntrYX*; (cruzes) proteína NtrX N-truncada com adição de 10 nmol/L de DNA plasmídeo contendo o promotor σ^{70} dos genes *ntrYX*; (círculos abertos) proteína NtrC com adição de 10 nmol/L de DNA plasmídeo contendo o promotor σ^{54} dos genes *glnBA* e a região de ligação da proteína NtrC; (círculos fechados) proteína NtrX N-truncada com adição de 10 nmol/L de DNA plasmídeo contendo o promotor σ^{54} dos genes *glnBA* e a região de ligação da proteína NtrC; (quadrados abertos) proteína NtrC com adição de 10 mmol/L de carbamil-fosfato; (quadrados fechados) proteína NtrX N-truncada com adição de 10 mmol/L de carbamil-fosfato; (triângulos abertos) proteína NtrC com adição de 10 mmol/L de carbamil-fosfato e 10 nmol/L de DNA plasmídeo contendo o promotor σ^{54} dos genes *glnBA* e a região de ligação da proteína NtrC; (triângulos fechados) proteína NtrX N-truncada com adição de 10 mmol/L de carbamil-fosfato e 10 nmol/L de DNA plasmídeo contendo o promotor σ^{54} dos genes *glnBA* e a região de ligação da proteína NtrC. (*) indicam os valores de atividade de ATPase significativamente aumentados ($p < 0,05$).

Figura 21: Seqüência de nucleotídeos da região promotora do gene *glnB* de *A. brasilense*

```

-288  CACCTTGTCCATCAATGTGAAAAGCCGGGTGGAAAGCCGGCGCTACCCCATCCAA

-233  CGGACAAGGCTTGCGGGATTGCTTGCAGCATGTGCACAAATATTGTTCACTTCGCC
          NtrC UAS-2          NtrC UAS-1
          glnBp1  $\sigma^{70}$           RNA 1

-178  CTATCCGTTGGCAGTCGCGTGCCGCCACGGTGGCATCGGCCCGCTGCGGCCCGG
          NtrC UAS-3

-123  CATCCCACGCAGCCGATCGCAACCGCTCCGATTGGCACGCAACGTGCTTTACATC
          glnBp2  $\sigma^{54}$ 

-68   GGACCGTCGGCAGAGGCCTGGACGGTGCCTGCCGACGTTGGCACCTCGTACACGA
          RNA 2

-7    GAGACCCATG

```

Seqüência de nucleotídeos da região promotora do gene *glnB* de *A. brasilense* contida no plasmídeo pLHglnBTZ, utilizado nos ensaios de ATPase. Identificados os sítios de ligação para a proteína NtrC e o sítio de ligação para o fator sigma 54.

5. CONCLUSÕES

As análises da estrutura da proteína NtrX de *A. brasilense* sugerem que é uma proteína EBP regulada negativamente pela presença do *linker* (L1) entre os domínios N-terminal e central.

O sistema de indução utilizando a estirpe de *E. coli* BL21AI e L-arabinose como indutor foi mais eficiente para aumentar a solubilidade da proteína NtrX S.Tag N-truncada.

A atividade de ATPase da proteína NtrX S.Tag N-truncada é dependente de promotor sigma-54 e fosforilação, semelhante a proteína NtrC de *E. coli*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, v. 178 (16), p. 4830-4838, 1996.

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

ASSUMPÇÃO, M. C. Contribuição para o entendimento da função do operon *ntrYX* de *Azospirillum brasilense*. **Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR**, 2002.

ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. L.; NINFA, A. J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transduction factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, v. 269 (45), p. 28288-28293, 1994.

AUSTIN, S.; DIXON, R. The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. **EMBO J.**, v. 11(6), p. 2219-2228, 1992.

BABST, M.; WENDLAND, B.; ESTEPA, E. J.; EMR, S. D. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome. **EMBO J.**, v. 17, p. 2982-2993, 1998.

BODDEY, R.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, v. 95, p. 109-121, 1996.

BORDES, P.; WIGNESHWERARAJ, S. R.; SCHUMACHER, J.; ZHANG, X.; CHANEY, M.; BUCK, M. The ATP hydrolyzing transcription activator phage shock protein F of *Escherichia coli*: Identifying a surface that binds σ^{54} . **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 100 (5), p. 2278-2283, 2003.

BOURRET, R. B.; BORKOVICH, K. A.; SIMON, M. L. Signal transduction pathways involving proteins phosphorylation in prokaryotes. **Annual Rev. Biochem.**, v. 60, p. 401-441, 1991.

BUCK, M.; GALLEGOS, M. T.; STUDHOLME, D. J.; GUO, Y.; GRALLA, J. D. The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor. **J. Bacteriol.**, v. 182 (15), p. 4129-4136, 2000.

CAPELA, D; BARLOY-HUBLER, F.; GOUZY, J.; BOTHE, G.; AMPE, F.; BATUT, J.; BOISTARD, P.; BECKER, A.; BOUTRY, M.; CADIEU, E.; DREANO, S.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; KAHN, D.; KISS, E.; LELAURE, V.; MASUY, D.; POHL, T.; PORETELLE, D.; PUEHLER, A.; PURNELLE, B.; PAMSPERGER, U.; RENARD, C.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; WEIDNER, S.; GALIBERT, F. The chromosome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98 (17), p. 9877-9882, 2001.

CHANEY, M.; BUCK, M. the sigma 54-DNA binding domain includes a determinant of enhancer responsiveness. **Mol. Microbiol.**, v. 33(6), p. 1200-1209, 1999.

CHANG, C.; STEWART, R. C. The two-component system: regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 723-731, 1998.

D'AUTRÉAUX, B.; TUCKER, N. P.; DIXON, R.; SPIRO, S. A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. **Nature**, v. 437, p. 769-772, 2005.

de BRUIJN, F. J.; HILGERT, U.; STIGTER, J.; SCHNEIDER, M.; MEYER, Z. A. H.; KLOSSE, U.; PAWLOWSKI, K. Regulation of Nitrogen Fixation and Assimilation genes in the Free-Living Versus Symbiotic State. **Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives**, Chapman and Hall, New York – London, p. 33-44, 1990.

de FRANCESCO, R.; ZANETTI, G.; BARBIERI, P.; GALLI, E. Auxin production by *Azospirillum brasilense* under different culture conditions. In: KLINGMÜLLER, W. ed. **Azospirillum III: genetics, physiology, ecology**. Berlin: Springer-Verlag, p. 109-115, 1985.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 175 (9), p. 2507-2515, 1993.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4143-4169, 1996.

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

DIXON, R; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Rev – Microbiol.**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DOUCLEFF, M.; CHEN, B.; MARIS, A. E.; WEMMER, D. E.; KONDRASHKINA, E.; NIXON, B. T. Negative regulation of AAA+ ATPase assembly by two component receiver domains: a transcription activation mechanism that is conserved in mesophilic and extremely hyperthermophilic bacteria. **J. Mol. Biol.**, v. 353, p. 242-255, 2005.

DREPPER, T.; WIETHAUS, J.; GIAOURAKIS, D.; GROß, S.; SCHUBERT, B.; VOGT, M.; WIENCEK, Y.; McEWAN, A. G.; MASEPOHL, B. Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 258, p. 250-256, 2006.

FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 281-8, 1999.

HAKENBECK, R.; STOCK, J. B. Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. **Meth. Enzymol.**, v. 273, p. 281-300, 1996.

HAWKES, T.; MERRICK, M.; DIXON, R. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulatory promoters from *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 201, p. 492-498, 1985.

HANSON, P. I.; WHITEHEART, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. **Nature Rev – Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 519-529, 2005.

HATTENDORF, D. A.; LINDQUEST, S. L. Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. **EMBO J.**, v. 21, p. 12-21, 2002.

HOCH, J. A. Two-component and phosphorelay signal transduction. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, p. 165-170, 2000.

HOREMANS, S.; VLASSAK, K. Production of indol-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense*. In: KLINGMÜLLER, W. ed. **Azospirillum III: genetics, physiology, ecology**. Berlin: Springer-Verlag, p. 109-115, 1985.

HUERGO, L.F.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 233, p. 33-40, 2003.

HURLEY, J. H.; DEAN, A. M.; SOHL, J. L.; KOSHLAND, D. E. Jr.; STROUD, R. M. Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. **Science**, v. 249, p. 1012-1016, 1990.

IACOPINI, P.; CAPPELLINI, A. Experiments of *Azospirillum* bacterization of maize seeds in open field. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Acad. Pub., p. 357-358, 1991.

ISHAC, Y. Z. Inoculation with associative N₂-fixers in Egypt. In: SKINNER, F. A.; BODDEY, R. M.; FENDRIK, I. **Nitrogen Fixation with non-legumes**. Dordrecht: Kluwer Acad. Pub., p. 241-246, 1989.

ISHIDA, M.L.; ASSUMPÇÃO, M.C.; MACHADO, H.B.; BENELLI, E.M.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35(6), p. 651-61, 2002.

JOHNSON, L. N.; O'REILLY, M. Control by phosphorylation. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 6, p. 762-769, 1996.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. **Can. J. Microbiol.**, v. 31, p. 881-887, 1985.

KARATA, K.; INAGAWA, T.; WILKINSON, A. J.; TATSUTA, T.; OGURA, T. Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 26225-26232, 1999.

KLOSE, K. E.; WEISS, D. S.; KUSTU, S. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NtrC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. **J. Mol. Biol.**, v. 232, p. 67-78, 1993.

KLOSE, K. E.; NORTH, A. K.; STEDMAN, K. M.; KUSTU, S. The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein NtrC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. **J. Mol. Biol.**, v. 241, p. 233-245, 1994.

LEE, S. Y.; DE LA TORRE, A.; YAN, D.; KUSTU, S.; NIXON, B. T.; WEMMER, D. E. Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. **Genes Dev.**, v. 17, p. 2552-2563, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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

LUPAS, A.; Van DYKE, M.; STOCK, J. Predicting coiled coils from protein sequences. **Science**, v. 252, p. 1162-1164, 1991.

MACHADO, H. B. Organização estrutural e regulação do operon ORF1-*ntrB*-*ntrC* em *A. brasilense*. **Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR**, 1995 a.

MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 674-684, 1995 b.

MAGASANIK, B. Reversible phosphorylation of an enhancer-binding protein regulates the transcription of nitrogen-regulated genes. **Trends Biochem. Sci.**, v. 13, p. 475-479, 1988.

MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; AMEMURA, M.; MAKATA, A. Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*: homology between the PhoR and EnvZ proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 192, p. 549-556, 1986.

MATVEEVA, E. A.; HE, P.; WHITEHEART, S. W. N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein contains high and low affinity ATP-binding sites that are functionally distinct. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 26413-26418, 1997.

MIROUX, B.; WALKER, J.E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J. Mol. Biol.** v.260, p. 289-298, 1996.

MIZUNO, T.; WURTZEL, E. T.; INOUE, M. Osmoregulation of gene expression. II. DNA sequence of the *envZ* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization its gene product. **J. Biol. Chem.**, v. 257(22), p. 13692-13698, 1982.

MOORE, J. B.; SHIAU, S. P.; REITZER, L. J. Alterations of highly conserved residues in the regulatory domain of nitrogen regulatory I (NtrC) of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 2692-2701, 1993.

MORGENSTERN, E.; OKON, Y. The effect of *Azospirillum brasilense* and auxin on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* X *Sorghum sudanense*. **Arid Soil Res. Rehabilitation**, v. 1, p. 115-127, 1987.

NEUWALD, A. F.; ARAVIND, L.; SPOUGE, J. L.; KOONIN, E. V. AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Res.**, v. 9, p. 27-43, 1999.

NIERMAN, W. C.; *et al.* Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p. 4136-4141. 2001.

NINFA, A. J.; ATKINSON, M. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 172-179, 2000.

NINFA, A. J.; MAGAZANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcriptions of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 5909 – 5913, 1986.

NIXON, B. T.; RONSON, C. W.; AUSUBEL, F. M. Two component regulatory system responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 7850-7854, 1986.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends Biotech.**, v. 3, p. 223-228, 1985.

OKON, Y.; FALLIK, E.; SARIG, S.; YAHALOM, E.; TAL, S. Plant growth promoting effect of *Azospirillum*. In: BOTHE, H.; DE BRUIJN, F.; NEWTON, W. E. Eds. **Nitrogen fixation: hundred years after**. New York: Gustav Fischer, p. 741-746, 1988.

PARK, S.; MEYER, M.; JONES, A. D.; YENNAWAR, H. P.; YENNAWAR, N. H.; NIXON, B. T. Two-component signaling in the AAA+ ATPase DctD: binding Mg²⁺ and BeF₃⁻ selects between alternative dimeric states of the receiver domain. **FASEB J.**, v. 16, p. 1964-1966, 2002.

PARKINSON, J. S.; KOFOID, E. C. Communication modules in bacterial signaling protein. **Annual Rev. Gen.**, v. 26, p. 71-112, 1992.

PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; BRUIJN, F. J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Mol. Gen. Genetics**, p. 124 – 138, 1991.

PELTON, J. G.; KUSTU, S.; WEMMER, D. E. Solution structure of the DNA-binding domain of NtrC with three alanine substitutions. **J. Mol. Biol.**, v. 292, p. 1095-1110, 1999.

PEREGO, M.; COLE, S. P.; BURBULYS, D.; TRACH, K.; HOCH, J. A. Characterization of the gene for a protein kinase which phosphorylates the sporulation-regulatory proteins Spo0A and Spo0F of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 171 (11), p. 6187-6196, 1989.

PIOSZAK, A. A.; NINFA, A. J. Mutations altering the N-terminal receiver domain of NRI (NtrC) that prevent dephosphorylation by the NRII-PII complex in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 5730-5740, 2004.

PITTARD, A. J.; DAVIDSON, B. E. TyrR protein of *Escherichia coli* and its role as repressor and activator. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 1585-1592, 1991.

POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. **Cambridge: Cambridge University Press**, 252p., 1982.

REITZER, L. J.; MAGAZANIK, B. Isolation of the nitrogen assimilation regulator NRI, the product of the *glnG* gene of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 5554 – 5558, 1983.

ROMBEL, I.; NORTH, A.; HWANG, I.; WYMAN, C.; KUSTU, S. The bacterial enhancer-binding protein NtrC as a molecular machine. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, sym. 63, p. 157-166, 1998.

SALLAI, L.; TUCKER, P. A. Crystal structure of the central and C-terminal domain of the sigma(54)-activator ZraR. **J. Struct. Biol.**, v. 151 (2), p. 160-170, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2^a ed., 3v, New York: **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1989.

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; STOCK, A. M.; BURLINGAME, A. L.; KOSHLAND, D. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 21770-21778, 1989.

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

SAYLE, R. A.; MILNER-WHITE, E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. **Trends Biochem. Sci.**, v. 20 (9), p. 375-376, 1995.

SCHULTZ, J.; MILPETZ, F.; BORK, P.; PONTING, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains, **PNAS**, v. 95 (11), p. 5857-5864, 1998.

SCHUMACHER, J.; ZHANG, X.; JONES, S.; BORDES, P.; BUCK, M. ATP-dependent transcriptional activation by bacterial PspF AAA+ protein. **J. Mol. Biol.**, v. 338 (5), p. 863-875, 2004.

SCHUMACHER, J.; JOLY, N.; RAPPAS, M.; ZHANG, X.; BUCK, M. Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. **J. Struct. Biol.**, *in press*, 2006.

STEEL, G. J.; HARLEY, C.; BOYD, A.; MORGAN, A. A screen for dominant negative mutants of SEC18 reveals a role for the AAA protein consensus sequence in ATP hydrolysis. **Mol. Biol. Cell.**, v. 11, p. 1345-1356, 2000.

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

STUDHOLME, D. J.; DIXON, R. Domain architectures of σ^{54} -dependent transcriptional activators. **J. Bacteriol.**, v. 185 (6), p. 1757-1767, 2003.

STOCK, J. B.; STOCK, A. M.; MOTTONEN, J. M. Signal transduction in bacteria. **Nature**, v. 344, p. 395-400, 1990.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 183-215, 2000.

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

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

TIEN, T.M.; GASKIN, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 219-226, 1979.

TON-HOANG, B.; SALHI, M.; SCHUMACHER, J.; DA RE, S.; KAHN, D. Promoter-specific involvement of the FixJ receiver domain in transcriptional activation. **J. Mol. Biol.**, v. 312, p. 583-589, 2001.

TUCKERMAN, J. R.; GONZALES, G.; GILLES-GONZALES, M. A. Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. **J. Mol. Biol.**, v. 308, p. 449-455, 2001.

TWERDOCHLIB, A. L.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. Expression, purification and DNA

binding activity of the solubilized NtrC protein of *herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expr. Purif.**, v. 30, p. 117-123, 2003.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Mol. Genet. Genomics**, v. 266, p. 813-820, 2002.

VITORINO, J. C.; STEFFENS, M. B. R.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Potential roles for the *glnB* and *ntrYX* genes in *Azospirillum brasilense*. **FEMB Microbiol. Lett.**, v. 201, p. 199-204, 2001.

WEISS, D. S.; BATUT, J.; KLOSE, K. E.; KEENER, J.; KUSTU, S. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. **Cell**, v. 67, p. 155-167, 1991.

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

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. **Oxford University Press**, p. 335-364, 1995.

WIDDICK, D.; FAREZ-VIDAL, E.; AUSTIN, S.; DIXON, R. Properties of a mutant form of the prokaryotic enhancer binding protein, NTRC, which hydrolyses ATP in the absence of effectors. **FEBS Lett.**, v. 437, p. 70-74, 1998.

XU, H.; HOOVER, T. R. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 138-144, 2001.

YAMADA-INAGAWA, T.; OKUNO, T.; KARATA, K.; YAMANAKA, K.; OGURA, T. Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 50182-50187, 2003.

YANG, X. F.; JI, Y.; SCHNEIDER, B. L.; REITZER, L. Phosphorylation-independent dimer-dimer interactions by the enhancer-binding activator NtrC of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 36708-36714, 2004.