

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUÍZA MARIA DE ARAÚJO

**ESTUDO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS TRANSDUTORAS DE SINAL
GLNB E GLNZ DE *Azospirillum brasilense***

CURITIBA

2008

LUÍZA MARIA DE ARAÚJO

**ESTUDO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS TRANSDUTORAS DE SINAL
GLNB E GLNZ DE *Azospirillum brasilense***

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leda Satie Chubatsu
Co-orientador: Prof. Dr. Fábio O. Pedrosa

CURITIBA

2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Leda Satie Chubatsu pela orientação, ensinamento e sugestões fundamentais durante o transcorrer desta tese e para minha formação acadêmica.

Agradeço ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalho, chance do desenvolvimento desta tese e pela orientação prestada.

Agradeço imensamente ao professor Emanuel M. de Souza e à professora Elaine Machado Benelli pelas discussões, sugestões, interesse e dedicação durante toda a minha permanência no departamento.

Aos demais professores e técnicos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio pela ajuda, orientação e pelo tempo dedicado a mim durante o transcorrer desta tese.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que permitiu a realização deste trabalho e ao CNPq, CAPES, programa PRONEX e FUNPAR pelo suporte financeiro.

A todos os representantes do Núcleo de Fixação de Nitrogênio e em especial aos meus colegas da sala 271 pelas dicas, empréstimos, auxílio, convívio diário, amizade e companheirismo.

Aos meus queridos amigos e grandes companheiros Elaine S., Murilo, Charles, Aninha, Renata G, Deise S., Prof^(a). Fernando, Alcides e Márcia, Rose K. e Drica pela grande amizade, carinho e pelo exemplo de vida e luta que muitos me deram.

Ao Marcelo e Clayton, meus irmãos de coração, simplesmente por fazerem parte da minha vida e tornarem-na mais feliz.

As três pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Luiz A. e Vera M. de Araújo e a Paula Eloisa Sus pelo amor incondicional, carinho, compreensão, dedicação, por terem sempre me incentivado, ajudado, torcido por mim e, além disso, por tudo que vocês já me ensinaram. Vocês definitivamente são o que tenho

de mais importante e mais AMO na minha vida.

Ao anjinho mais lindo e encantador desse mundo, Caiman Araújo, meu sobrinho, pelo doce de pessoa que você é e a minha irmã Samanta L. de Araújo por sempre ter torcido por mim.

Àqueles que não estão mais presentes, mas que deixaram marcas profundas e lembranças eternas em minha vida.

O Menestrel

"Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma.

E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança.

E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.

E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam...

E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.

Descobre que leva-se anos para construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem da vida.

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa - por isso, sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo, e se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve.

Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências.

Aprende que paciência requer muita prática.

Descobre que algumas vezes, a pessoa que você espera que o chute quando você cai, é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.

Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

(William Shakespeare)

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma bactéria diazotrófica de vida livre, Gram-negativa, endofítica facultativa, que se associa com inúmeras plantas de importância agrícola como milho, trigo, sorgo e arroz, e portanto tem um potencial como biofertilizante. A proteína GlnD, produto do gene *glnD*, é uma das proteínas envolvidas na regulação do metabolismo do nitrogênio. Esta proteína é responsável pela modificação covalente das proteínas PII, GlnB e GlnZ, de acordo com o nível intracelular de nitrogênio. Em *A. brasilense*, a proteína NifA é requerida na ativação da transcrição dos genes de fixação do nitrogênio, genes *nif*, em resposta ao nível de oxigênio e nitrogênio. O domínio N-terminal da proteína NifA está envolvido no controle relacionado com o nitrogênio fixado. Este controle também envolve a proteína sinalizadora dos níveis de nitrogênio, GlnB, provavelmente por interação entre ela e o domínio N-terminal de NifA. Neste trabalho, foi descrita a purificação da proteína GlnD de *A. brasilense* e a atividade desta na uridililação e desuridililação das proteínas purificadas GlnB e GlnZ desse organismo. A proteína GlnD foi expressa em *Escherichia coli* como uma proteína de fusão com uma seqüência HisTag e purificada por cromatografia de afinidade usando a coluna HiTrap-Chelating-Ni²⁺. A proteína GlnD foi eluída com imidazol e apresentou uma pureza de 99%. O efeito do ATP e α -cetogluturato na uridililação das proteínas PII (GlnB, GlnB-His e GlnZ) de *A. brasilense* pela proteína GlnD-His foi determinado. A proteína GlnD-His foi capaz de uridililar completamente a proteína GlnB após 30 minutos de reação, e parcialmente GlnZ. A uridililação parcial de GlnZ parece ser uma característica desta proteína. ATP e α -cetogluturato foram necessários para uridililação das proteínas. Já glutamina causou aproximadamente 70% de inibição da reação de uridililação. Para estudar a interação entre GlnB e NifA, um fragmento de DNA amplificado por PCR codificando para a região N-terminal de NifA foi clonado no vetor de expressão pET28a permitindo que o domínio N-terminal fosse expresso em *Escherichia coli* como uma fusão a um seqüência HisTag. A fusão NifA-N-terminal-His também foi purificada por cromatografia de afinidade alcançando 99% de pureza. A proteína GlnB foi expressa em *E. coli* e purificada na sua forma nativa. A interação direta do domínio N-terminal de NifA com a proteína GlnB foi medida por ensaios de “pull-down” usando “beads” magnéticos de Ni⁺⁺-NTA. Nestes ensaios, os resultados mostraram que a proteína GlnB de *A. brasilense* interage diretamente

com o domínio N-terminal de NifA. Os cofatores ATP e α -cetoglutarato, juntos ou separados, não influenciaram a interação em nenhuma das condições testadas.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*. Fixação biológica de nitrogênio. Proteínas PII. GlnB. GlnZ. GlnD. NifA.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a diazotrophic bacterium which associates with important agricultural crops such as maize, wheat and rice and thus has potential as a nitrogen biofertilizer. The GlnD protein, product of the *glnD* gene, is one of the proteins involved in the nitrogen metabolism regulation. This protein is responsible for the covalent modification of the PII proteins, GlnB and GlnZ, according to intracellular nitrogen levels. The *A. brasilense* transcription regulator NifA is required to activate transcription of nitrogen-fixing genes (*nif*) in response to both nitrogen and oxygen. The NifA N-terminal domain is involved in the control by fixed nitrogen. This control also involves the nitrogen-status-signalling protein GlnB probably by direct interaction between the NifA N-terminal domain and GlnB. In this work, we described the purification of the *A. brasilense* GlnD protein and its activity on the uridylylation of purified *A. brasilense* GlnB and GlnZ proteins. GlnD was over-expressed in *Escherichia coli* as a His-tag fusion protein and purified using affinity chromatography on a HiTrap-Chelating-Ni²⁺ column. The protein, eluted with 500mM imidazole, was 99% pure. The effect of ATP, glutamine and α -ketoglutarate on the uridylylation of purified *A. brasilense* GlnB, GlnB-His and GlnZ proteins by GlnD-His was determined. The GlnD protein was able to fully uridylylate GlnB after 30 minutes reaction, but GlnZ was never completely uridylylated in any condition tested. ATP and α -ketoglutarate were required for maximum uridylylation, whereas glutamine caused approximately 70% inhibition of the reaction. To study GlnB and NifA interaction, a PCR-amplified DNA fragment coding for the NifA N-terminal region was cloned into the expression vector pET28a allowing the N-terminal domain to be over-expressed in *Escherichia coli* as a fusion to a His-tagged sequence. The NifA-N-terminal-His fusion protein was also purified by affinity chromatography to 99% purity. GlnB protein was over-expressed in *E. coli* and purified as a native protein. The direct interaction of the NifA-N-terminal domain and the native GlnB protein was measured by pull-down assays using Ni⁺⁺-NTA magnetic beads. These results showed that *A. brasilense* GlnB interacts directly with the NifA N-terminal domain. The GlnB co-factors, ATP and α -ketoglutarate, alone or together, did not influence this interaction under the conditions tested.

Key words: *Azospirillum brasilense*. Nitrogen fixation. PII proteins. GlnB. GlnZ. GlnD. NifA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE NTRC E DA GLUTAMINA SINTETASE EM RESPOSTA AOS NÍVEIS DE NITROGÊNIO INTRACELULAR	10
FIGURA 2 -	SISTEMA NTR EM <i>Azospirillum brasilense</i>	12
FIGURA 3 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MULTIPLICIDADE POTENCIAL DE VIAS DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS PII	14
FIGURA 4 -	MODELO ESTRUTURAL DO MONÔMERO DA PROTEÍNA GLNB DE <i>E. coli</i> (NINFA e ATKINSON et al., 2000)	16
FIGURA 5 -	MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GLNB DE <i>E. coli</i> NA FORMA TRIMÉRICA	17
FIGURA 6 -	MODELO DA ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS GENES <i>nif</i>	27
FIGURA 7 -	COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO N-TERMINAL DAS PROTEÍNAS NIFA DE <i>H. seropedicae</i> E <i>A. brasilense</i> .	60
FIGURA 8 -	PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CORRESPONDENTE AO DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE <i>A. brasilense</i>	64
FIGURA 9 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS PROVÁVEIS CLONES DA REGIÃO N-TERMINAL DO GENE <i>nifA</i> NO VETOR pCR2.1	65
FIGURA 10 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS PROVÁVEIS CLONES DA REGIÃO N-TERMINAL DO GENE <i>nifA</i> NO VETOR pDK7	66
FIGURA 11 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO pLANTpET E DO CONTROLE pET28a DIGERIDOS COM AS ENZIMAS <i>XbaI</i> E <i>HindIII</i>	67
FIGURA 12 -	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pLANTDK7MP	68
FIGURA 13 -	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pLANifApET	70
FIGURA 14 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA NIFANT-HIS DE <i>A. brasilense</i> EXPRESSA EM <i>E. coli</i> A PARTIR DO PLASMÍDEO pLANTpET	74
FIGURA 15 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA NIFA-HIS DE <i>A. brasilense</i> EXPRESSA EM <i>E. coli</i> A PARTIR DO PLASMÍDEO pLANifApET	75
FIGURA 16 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DAS CURVAS DE EXPRESSÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL DE NIFA A PARTIR DO PLASMÍDEO pLANTpET	76
FIGURA 17 -	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NIFANT-HIS EM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>E. coli</i>	77
FIGURA 18 -	EFEITO DO PH E DE DIFERENTES REAGENTE NA SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA NIFANT-HIS	78
FIGURA 19 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES DA PROTEÍNA NIFANT-HIS OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	81
FIGURA 20 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES DA PROTEÍNA NIFA-HIS PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	83
FIGURA 21 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES DAS PROTEÍNAS PII NATIVAS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	86
FIGURA 22 -	PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA GLND-HIS DE <i>A. brasilense</i>	88
FIGURA 23 -	PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS GLNB-HIS E GLND-HIS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	89
FIGURA 24 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA PROTEÍNA GLND NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>Azospirillum brasilense</i>	94
FIGURA 25 -	EFEITO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>Azospirillum brasilense</i>	95
FIGURA 26 -	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ATP NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>A. brasilense</i>	98
FIGURA 27 -	EFEITO DO α -CETOGLUTARATO NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>A. brasilense</i>	99
FIGURA 28 -	EFEITO DA GLUTAMINA NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII PELA PROTEÍNA GLND DE <i>A. brasilense</i>	102
FIGURA 29 -	EFEITO DA GLUTAMINA NA DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>A. brasilense</i>	103

FIGURA 30 - EFEITO DO MSX NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII PELA PROTEÍNA GLND DE <i>A. brasilense</i>	105
FIGURA 31 - ENSAIOS DE RETENÇÃO DAS PROTEÍNAS NIFANT-HIS E GLNZ DE <i>A. brasilense</i>	108
FIGURA 32 - INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS NIFANT-HIS E GLNB DE <i>A. brasilense</i>	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	ESTIRPES DE BACTÉRIAS	36
TABELA 02 -	PLASMÍDEOS	37
TABELA 03 -	CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS	41
TABELA 04 -	SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTE	50
TABELA 05 -	SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>nifA</i> DE <i>A. brasilense</i>	61
TABELA 06 -	ESQUEMA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NIFANT-HIS DE <i>A. brasilense</i>	82

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrilo
ADP	5' difosfato de adenosina
Amp	Ampicilina
AMP	5' monofosfato de adenosina
ATase	Enzima adeniltransferase
ATP	5' trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
Cm	Cloranfenicol
D.O.	Densidade ótica
DEAE	Dietilaminoetil
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	5'-trifosfato de 2'-desoxinucleotídeo
DraG	Dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	Dinitrogenase ADP-ribosil transferase
DTT	Ditiotreitol
e ⁻	Elétron
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
FPLC	Cromatografia líquida de performance rápida (“Fast Performance Liquid Chromatography”)
GDH	Glutamato desidrogenase
GLN	Glutamina
GlnB-UMP	Proteína GlnB uridililada
GlnK-UMP	Proteína GlnK uridililada
GlnZ-UMP	Proteína GlnZ uridililada
GLU	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintase
GMP	5' monofosfato de guanosina
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GS	Glutamina sintetase
GS-AMP	Proteína GS adenililada
IHF	Fator de integração do hospedeiro (“Integration Host Factor”)
IPTG	β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilo dalton
kΩ	Quilo Ohms
Km	Canamicina
kV	Quilo volts

L	Litro
m/v	Massa por volume
Mpb	Mega pares de base
MSX	L-metionina-S-sulfoximina
NaDOC	Desoxicolato de Sódio
NAD ⁺	Nicotinamida- adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida- adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida- adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Nal	Ácido nalidixico
<i>nif⁺</i>	Genótipo de capacidade de fixação de nitrogênio
NifH-ADPR	Proteína NifH-ADP-ribosilada
NtrC-P	Proteína NtrC fosforilada
N ₂ ase	Nitrogenase
ONPG	o-nitrofenol-β-D-galactopiranosídeo
ORF	Seqüência codificadora de proteína (“ O pen R eadin G F rame”)
pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
Pi	Fosfato inorgânico
PII-UMP	Proteína PII uridililada
PMSF	α-toluenosulfonil floreto
RBS	Sítio de ligação do ribossomo (“ R ibosome B inding S ite”)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Sm	Estreptomicina
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TEMED	N, N, N', N' – tetrametil, etilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	Unidade enzimática
UAS	Seqüência do ativador a montante (“ U pstream A ctivat S eqüência”)
UMP	5' monofosfato de uridina
UTP	5' trifosfato de uridina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Azospirillum</i> sp.	1
1.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	3
1.2.1	Nitrogenase	4
1.2.2	Genes <i>nif</i>	5
1.3	ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO	6
1.4	SISTEMA NTR	7
1.4.1	O sistema NTR em <i>Azospirillum brasilense</i>	11
1.5	PROTEÍNAS PII	13
1.5.1	Estrutura das proteínas da família PII	14
1.5.2	Proteína GlnK	18
1.5.3	Formação de heterotrímeros entre GlnB e GlnK.....	19
1.5.4	Papel das moléculas efectoras de PII.....	20
1.5.5	Proteínas PII de <i>Azospirillum brasilense</i>	21
1.6	PROTEÍNA GLND	24
1.6.1	Uridililação das proteínas GlnB e GlnZ de <i>A. brasilense</i>	25
1.7.	REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO.....	25
1.7.1	Regulação da expressão dos genes <i>nif</i>	25
1.7.2	Regulação da fixação de nitrogênio em <i>Azospirillum brasilense</i>	27
1.7.3	Proteína NifA.....	28
1.7.4	Envolvimento da proteína PII no controle da atividade de NifA	30
1.8.	REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA NITROGENASE.....	32
2	JUSTIFICATIVA.....	34
3	OBJETIVOS.....	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	36
4.2	REAGENTES	38
4.3	MEIOS DE CULTURA	39
4.3.1	Meios empregados para o cultivo de <i>A. brasilense</i>	39
4.3.2	Meios empregados para o cultivo de <i>E. coli</i>	40
4.4	ANTIBIÓTICOS	41
4.5	CONDIÇÕES DE CULTIVO	41
4.6	ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS.....	42
4.7	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE <i>Azospirillum brasilense</i>	42
4.8	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>nifA</i> DE <i>A. brasilense</i>	43
4.9	PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	44
4.10	SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE DNA.....	44
4.11	CLIVAGEM DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	45
4.12	PREPARO DOS VETORES.....	45
4.13	LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR.....	45
4.14	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	46
4.14.1	Preparo de células eletrocompetentes para eletroporação.....	46
4.14.2	Transformação bacteriana.....	46
4.15	EXTRAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	47
4.16	SEQUENCIAMENTO DO DNA	47
4.17	TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO	48
4.18	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE.....	49
4.19	ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)	49
4.20	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NIFA E NIFA-HIS DE <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i>	50
4.21	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NIFA-HIS E NIFANT-HIS DE <i>A. brasilense</i>	51
4.22	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GLNB-HIS E GLND-HIS DE <i>A. brasilense</i>	52
4.23	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GLNB E GLNZ NATIVAS	53
4.24	DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD	53
4.25	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES NÃO-DESNATURANTES	54

4.26	REAÇÃO DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>A. brasilense in vitro</i>	54
4.27	REAÇÃO DE DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE <i>A. brasilense in vitro</i>	55
4.28	“IMMUNOBLOTTING”.....	56
4.29	ANÁLISE DAS PROTEÍNAS GLNB, NIFA-HIS E NIFANT-HIS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	56
4.30	ENSAIO DE INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE AS PROTEÍNAS DO TIPO PII E A PROTEÍNA NIFANT-HIS (“pull-down”).....	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	OBTENÇÃO DOS DOMÍNIOS SEPARADOS E DA PROTEÍNA NIFA INTEIRA DE <i>A. brasilense</i>	59
5.1.1	Construção de plasmídeos contendo a região que codifica para o domínio N-Terminal da proteína NifA.....	61
5.1.2	Construção de plasmídeos contendo o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i>	69
5.2	EXPRESSÃO E SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA NIFA DE <i>A. brasilense</i> E DO SEU DOMÍNIO N-TERMINAL.....	71
5.3	PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL E DA PROTEÍNA NIFA DE <i>A. brasilense</i>	79
5.4	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII (GLNB E GLNZ) E GLND DE <i>A. brasilense</i>	84
5.4.1	Purificação das proteínas GlnB e GlnZ nativas por cromatografia afinidade.....	84
5.4.2	Expressão e purificação das proteínas GlnD-His e GlnB-His por cromatografia de afinidade.....	87
5.5	URIDILILAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS PROTEÍNAS PII DE <i>A. brasilense</i>	90
5.5.1	Efeito do tempo de incubação e da concentração de GlnD-His na uridililação das proteínas PII de <i>A. brasilense</i>	90
5.5.2	Efeito do ATP e α -cetoglutarato na uridililação das proteínas PII de <i>A. brasilense</i>	96
5.5.3	Efeito da glutamina na uridililação e desuridililação das proteínas PII de <i>A. brasilense</i>	100
5.5.4	Efeito da metionina sulfoximina na uridililação das proteínas PII de <i>A. brasilense</i>	104
5.6	INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE AS PROTEÍNAS NIFANT-HIS E PII DE <i>A. brasilense</i>	106
6.	CONCLUSÕES	110
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
	APÊNDICES	136

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Azospirillum* sp.

O gênero *Azospirillum* é constituído por bactérias diazotróficas (capazes de fixar nitrogênio), aeróbicas, Gram-negativas, curvas, móveis, microaerofílicas e endofíticas facultativas. Estas bactérias são encontradas no solo ou associadas com raízes de várias plantas como o milho, trigo, sorgo e arroz em regiões temperadas, subtropicais e tropicais por todo o mundo (DÖBEREINER e DAY, 1976; DÖBEREINER, 1991; CRUZ et al., 2001; GUNARTO et al., 1999). Algumas espécies podem colonizar não só a rizosfera, mas também o interior de raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Estas bactérias já foram isoladas de raízes de mais de 100 espécies de plantas, podendo também ser aplicadas com sucesso a raízes de plantas que não apresentam histórico de colonização com *Azospirillum* (BASHAN et al., 2004).

Este gênero faz parte das α -Proteobactérias (YOUNG et al., 1992) e apresenta 8 espécies, *A. brasilense*, *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. irakense* (KHAMAS et al., 1989), *A. largimobile* (DEKHIL et al., 1997), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001) e *Azospirillum oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005). Análises com diversas bactérias deste gênero indicam que estas possuem um genoma complexo, com cinco a sete megareplicons variando de 0,65 a 2,6 Mpb. Diversos megareplicons mostraram sinal de hibridização com o gene rDNA 16S, o que sugere a presença de múltiplos cromossomos nesta bactéria (MARTIN-DIDONET et al., 2000). Todas as espécies de *Azospirillum* são diazotróficas, e quando cultivadas em meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado formam uma película de crescimento característica. Esta película é formada por células que se deslocam para regiões do meio onde a concentração de oxigênio é compatível com a síntese e atividade da nitrogenase (DÖBEREINER e DAY, 1976).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são potencialmente benéficas para a agricultura, sendo encontradas na rizosfera onde proliferam utilizando exsudatos da raiz. Estas bactérias exibem quimiotaxismo positivo em direção a ácidos orgânicos,

açúcares, aminoácidos (BARAK et al., 1983; REINHOLD et al., 1985; ZHULIN e ARMITAGE, 1993) e compostos aromáticos (LOPEZ-DE-VICTORIA e LOVELL, 1993; LOPEZ-DE-VICTORIA et al., 1994). Um aumento significativo no rendimento da produção de grãos é observado com a inoculação de *Azospirillum* spp., juntamente com um aumento no conteúdo de fósforo, potássio e de nitrogênio total das plantas (BASHAN e HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004). De forma geral, *Azospirillum* pode influenciar positivamente o crescimento vegetal, o rendimento da safra e o conteúdo de nitrogênio da planta (citado em STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Em experimentos de inoculação em campo, *Azospirillum* foi capaz de aumentar o rendimento de várias gramíneas economicamente importantes como trigo, sorgo e milho, em solos e regiões climáticas diferentes (PATRIQUIN et al., 1983; OKON e VANDERLEYDEN, 1997). Apesar dos dados experimentais relativos ao estímulo do crescimento de plantas promovido por *Azospirillum*, o modo exato de ação pelo qual esta bactéria promove o aumento do crescimento da planta ainda não é totalmente compreendido (HOLGUIN et al., 1999). Vários estudos indicam que a inoculação de plantas com esta bactéria provoca a proliferação das raízes e aumenta a captação de água e sais minerais devido à ação provável de fitohormônios (MORGENSTERN e OKON, 1987). A teoria mais aceita é de que o efeito benéfico da associação com *Azospirillum* ocorra devido a uma soma de múltiplos mecanismos (BASHAN et al., 2004). As bactérias do gênero *Azospirillum* podem produzir vários fitohormônios (tais como giberilinas, ácido indolacético e etileno) e fixam nitrogênio em associação com plantas, porém a transferência de nitrogênio fixado para a planta associada parece ser limitada e nem sempre é detectada (BASHAN et al., 2004).

O mecanismo exato de interação entre a planta e *Azospirillum* spp. não é conhecido, mas acredita-se que em *Azospirillum brasilense* a sua adesão a rizosfera da planta ocorra em duas etapas distintas. A etapa inicial, reversível, é mediada pelo flagelo polar, seguida de uma segunda etapa, irreversível, de aderência mediada por polissacarídeos secretados pela bactéria (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004).

1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento essencial para a síntese de inúmeras biomoléculas como proteínas e ácidos nucléicos e, conseqüentemente, fundamental para a manutenção da vida na terra. O gás dinitrogênio, N_2 , é a forma mais abundante deste elemento e constitui quase 80% da atmosfera da Terra, entretanto nenhum eucarioto é capaz de utilizá-lo diretamente e somente bactérias diazotróficas conseguem metabolizá-lo (POSTGATE, 1982; TORTORA et al., 1995). A maioria dos grupos filogenéticos de bactérias, incluindo sulfo-bactérias, firmibactéria, actinomicetos, cianobactérias, proteobactérias e arqueobactérias possuem essas bactérias diazotróficas (DIXON e KAHN, 2004).

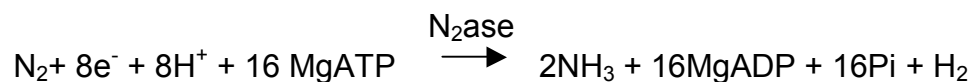
A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do dinitrogênio gasoso (N_2) a amônia (NH_3), forma metabolicamente utilizável pela maior parte dos organismos. Esse processo é catalisado pelo complexo enzimático denominado nitrogenase e ocorre exclusivamente em diazotrofos e requer condições ambientais favoráveis como ausência de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio e temperatura adequada (POSTGATE, 1982). Nitrogênio fixado e oxigênio afetam a expressão e atividade das proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio nos diversos organismos diazotrofos estudados (EADY, 1986; POSTGATE, 1982).

O elemento nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de plantas (DIXON e KAHN, 2004), e também o mais caro dos fertilizantes agrícolas (PEDROSA, 1987). De forma geral, nenhum vegetal é capaz de utilizar diretamente o nitrogênio atmosférico, sendo necessário o uso de fertilizantes nitrogenados ou a presença de microorganismo diazotrofos que convertam o nitrogênio atmosférico a amônia e o disponibilizem para o vegetal. A utilização de fertilizantes nitrogenados não só encarece os custos da produção agrícola, como também acarreta diversos danos ecológicos, uma vez que cerca de 50% do total de fertilizantes aplicados é perdida durante os processos de chuvas, erosões e ainda atividades bacterianas (PEDROSA, 1987). Entre os danos causados ao meio ambiente pelo uso de fertilizantes nitrogenados incluem-se eutrofização de rios e lagos, acidificação do solo e emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera (DIXON e KAHN, 2004). Além dos danos diretos causados ao solo durante a utilização de fertilizantes nitrogenados, no processo de produção destes ocorre uma demanda de grandes

quantidades de energia, normalmente oriunda da utilização de combustíveis fósseis, o que acarreta no aumento da emissão de dióxido de carbono, poluindo a atmosfera.

1.2.1 Nitrogenase

A nitrogenase é a enzima responsável pela fixação biológica de nitrogênio. Esta enzima catalisa a redução do dinitrogênio gasoso a amônio como mostra a seguinte reação (EADY, 1986; POSTGATE, 1982):



A nitrogenase é uma metaloenzima constituída por duas proteínas distintas, a dinitrogenase redutase, proteína Ferro (Fe) ou NifH, e a dinitrogenase, proteína Ferro-Molibdênio (FeMo) ou NifDK (DEAN e JACOBSEN, 1992; HOWARD e REES, 1996). A proteína Fe é um dímero constituído por duas subunidades γ idênticas com aproximadamente 60 kDa que são codificadas pelo gene *nifH* e ligadas por um núcleo 4Fe-4S (HOWARD e REES, 1994). A proteína Fe funciona como o único doador de elétrons para a proteína FeMo, com a transferência de elétrons acoplada à hidrólise de ATP (HOWARD e REES, 1996). A proteína FeMo é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ com massa molecular total de aproximadamente 230 kDa (HOWARD e REES, 1994). A subunidade α possui cerca de 55 kDa e é codificada pelo gene *nifD*. A subunidade β possui cerca de 60 kDa e é codificada pelo gene *nifK* (ROBERTS et al., 1978; KIM e REES, 1994). A proteína FeMo contém 2 átomos de molibdênio, 30 átomos de ferro e 32 átomos de enxofre organizados em 2 tipos de núcleos metálicos: o núcleo P (FeS) e o cofator ferro-molibdênio (FeMoco). Cada dímero $\alpha\beta$ contém um núcleo P e um cofator FeMoco (KIM e REES, 1994; SCHINDELIN et al., 1997). Separados, nenhum dos componentes da nitrogenase é capaz de reduzir o N_2 , mas reunidos, na presença de ATP e de uma fonte de baixo potencial de redução, são responsáveis pela catálise da reação de redução do dinitrogênio gasoso a amônio (POSTGATE, 1982; EADY, 1986)

Além dos genes *nifHDK*, a biossíntese e o funcionamento do complexo da nitrogenase requer o produto de outros genes, necessários para o transporte de

elétrons, regulação transcricional, biossíntese de cofatores e transporte de íons DIXON e KAHN, (2004).

Como a transferência de elétrons nesta reação é dependente da hidrólise de ATP, a redução do nitrogênio envolve um alto custo energético para a célula (YATES, 1992; DEAN et al., 1993). Em vista desse alto gasto energético, o processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado, tanto na atividade da nitrogenase como na expressão dos seus genes (POSTGATE, 1982). O controle da expressão dos genes estruturais do complexo enzimático nitrogenase é feito de maneira estritamente coordenada, envolvendo cascatas de genes regulatórios.

A nitrogenase catalisa não apenas a redução de dinitrogênio para amônio, como também a produção de H₂ e a redução de compostos como acetileno, azida e cianeto (HOWARD e REES, 1996).

1.2.2 Genes *nif*

Os genes *nif* (genes envolvidos com a fixação de nitrogênio) codificam proteínas essenciais para a biossíntese do complexo nitrogenase (MERRICK, 1982). No microorganismo *Klebsiella pneumoniae*, a fixação de nitrogênio foi mais bem estudada e foram identificados e seqüenciados 20 genes *nif* agrupados em um único regulon e distribuídos em 8 operons (*nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVW*, *nifZM*, *nifF*, *nifLA*, e *nifBQ*) (MERRICK, 1988, 1993). Desses 20 genes, pelo menos 14 são essenciais para a biossíntese das proteínas do complexo nitrogenase (MERRICK, 1988). Sendo que, os genes *nifHDK* são os genes estruturais da nitrogenase.

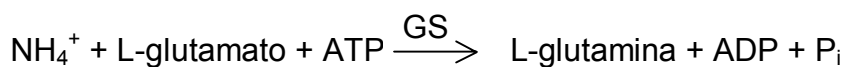
As proteínas codificadas pelos genes *nifLA* são responsáveis pelo controle da transcrição dos demais genes *nif*, sendo a proteína NifA ativadora de transcrição e a NifL reguladora de NifA em *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* e *Azotobacter vinelandii* (MERRICK, 1983, 1988; MERRICK et al., 1982).

Em *A. brasilense* os genes *nif* não são encontrados de forma agrupada como em *K. pneumoniae*, e sim espalhados em regiões distintas do genoma (PLAZINSKI et al., 1983; SINGH et al., 1989; GALIMAND et al., 1989; PASSAGLIA et al., 1991). Diferente do que ocorre em *K. pneumoniae*, onde o gene *nifA* faz parte do operon *nifLA*, em *A. brasilense* este gene é monocistrônico e nenhum gene homólogo ao *nifL* está presente no seu genoma.

1.3 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO

A amônia formada no processo de redução do N₂ atmosférico ou captada do meio externo é utilizada para a síntese de glutamina e glutamato. Na maioria das células, esses compostos servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas. Em procariotos a assimilação de amônia pode ocorrer por duas vias: na primeira, a glutamina sintetase (GS) catalisa a conversão de glutamato e amônia em glutamina (REAÇÃO 1) e a glutamato sintase (GOGAT) catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o α -cetoglutarato produzindo 2 moléculas de glutamato, uma reação dependente de NAD(P)H, (REAÇÃO 2). Na segunda via, a glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a conversão de amônia e α -cetoglutarato em glutamato, uma reação também dependente de NAD(P)H, (REAÇÃO 3) (MERRICK e EDWARDS, 1995).

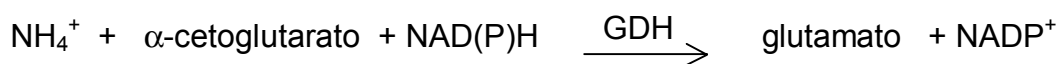
REAÇÃO 1



REAÇÃO 2



REAÇÃO 3



A via da GDH é utilizada quando as células crescem na presença de excesso de nitrogênio fixado, enquanto a via GS/GOGAT em condições limitantes (MERRICK e EDWARDS, 1995). Em *A. brasilense*, a via GS-GOGAT é a via predominante de assimilação de amônio independente da fonte de nitrogênio utilizada para crescimento (WESTBY et al., 1987). A GS é uma enzima dodecamérica e tem sua

atividade controlada pela adição covalente de um grupamento adenilil a cada uma de suas subunidades (ARCONDÉGUY et al., 2001).

1.4 SISTEMA NTR

O sistema regulador de nitrogênio, *ntr*, foi inicialmente descrito em bactérias entéricas como *E. coli* e *K. pneumoniae*. Este sistema compreende um conjunto de genes cujos produtos estão envolvidos no controle da expressão dos genes do metabolismo nitrogenado. Este controle do metabolismo do nitrogênio envolve a regulação da biossíntese e atividade de enzimas das vias de utilização de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos (MERRICK e EDWARDS, 1995).

Em *E. coli* este sistema foi inicialmente descrito com seis proteínas: NtrB (GlnL ou NtrII) (produto do gene *ntrB*), NtrC (GlnG ou NtrI) (produto do gene *ntrC*), GlnD (UTase/UR - uridililtransferase/enzima removedora de uridilil) (produto do gene *glnD*), PII (GlnB), GlnE (ATase - adenililtransferase/enzima removedora de adenilil) (produto do gene *glnE*) e glutamina sintetase (GS) (produto do gene *glnA*). (MERRICK e EDWARDS, 1995). A descoberta de uma segunda proteína da família PII (GlnK) em *E. coli* e em outros microorganismos aumentou a complexidade do sistema. Essas proteínas interagem em um complexo mecanismo em cascata esquematicamente apresentado na Figura 1 (MERRICK e EDWARDS, 1995, van HEESWIJK et al., 1996; ATKINSON e NINFA, 1998, 1999). Para facilitar a compreensão, o papel das proteínas PII, GlnB e GlnK, será discutido de forma geral, e a função específica de cada uma das proteínas no sistema Ntr será considerada posteriormente.

O sistema Ntr consiste de uma cascata regulatória, onde as proteínas PII controlam a atividade de outras proteínas de acordo com os níveis de nitrogênio intracelular. A atividade das proteínas NtrB, NtrC, GlnD e glutamina sintetase é dependente da relação α -cetoglutarato/glutamina (BUENO et al., 1985). O produto do gene *glnD* possui duas atividades catalíticas dependendo do nível intracelular de nitrogênio fixado (ADLER et al., 1975). Em concentrações limitantes de nitrogênio, quando a relação $[\alpha\text{-cetoglutarato/glutamina}]$ é alta, PII liga α -cetoglutarato induzindo uma mudança conformacional favorecendo uma conformação ótima para

sua uridililação pela proteína GlnD, que nessas condições possui atividade de uridililtransferase e catalisa então a adição de grupamentos UMP à proteína PII ligada a α -cetoglutarato (BROWN et al., 1971; ADLER, et al., 1975; BLOOM et al., 1978; ENGLEMAN e FRANCIS, 1978; KAMBEROV et al., 1994; JIANG et al., 1998a; JIANG et al., 1998b; JIANG et al., 1998c). A proteína PII-UMP não interage com NtrB que pode então catalisar a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a (Figura 1). NtrC fosforilada (NtrC-P) irá ativar a transcrição de genes envolvidos na assimilação de fontes alternativas de nitrogênio.

As proteínas NtrB e NtrC são membros de famílias de transdutores de sinal compostos por uma histidina quinase/fosfatase (NtrB) e a proteína regulatória correspondente (NtrC) (PORTER et al., 1995). Estes sistemas de transdução de sinal utilizam a fosforilação de um domínio conservado para controlar a atividade da proteína regulatória. A proteína NtrB catalisa a autofosforilação de um resíduo de histidina e este grupamento fosforil é posteriormente transferido para um resíduo de aspartato da proteína regulatória NtrC (KEENER e KUSTO, 1988; WEISS e MAGAZANIK, 1988; NINFA e BENNETT, 1991; NINFA et al., 1993). A proteína NtrC fosforilada é um ativador transcricional de genes envolvidos na utilização de fonte de nitrogênio, dependentes de promotores σ^N . Em *K. pneumoniae*, o gene *nifA*, cujo produto é ativador de transcrição dos genes da fixação do nitrogênio e o operon *glnAntrCB*, que responde pelo aumento de síntese de glutamina sintetase (GS) e NtrC, são ativados por NtrC-P (MERRICK, 1983; REITZER e MAGASANIK, 1985; MAGASANIK, 1989).

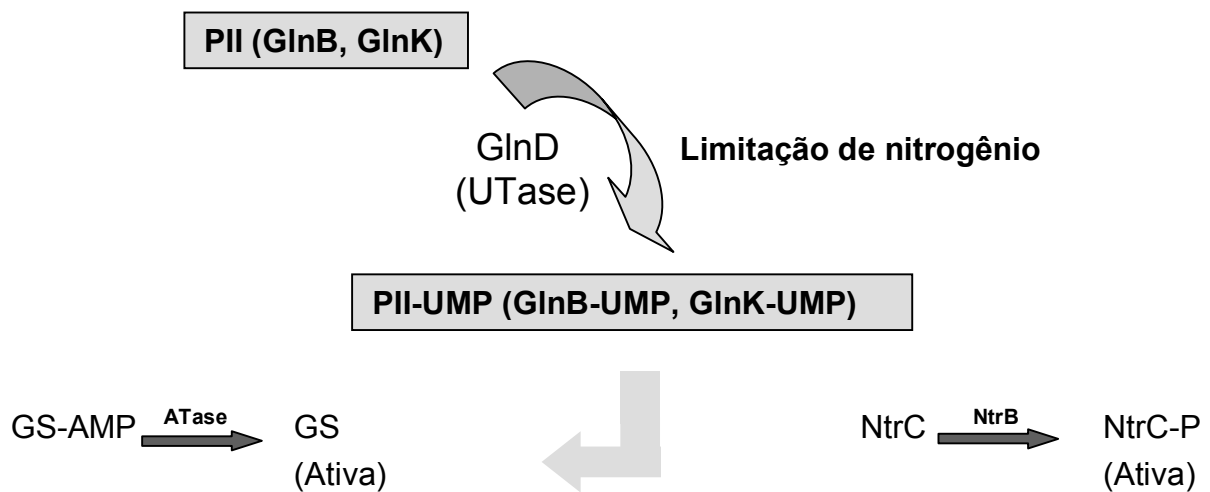
PII-UMP também interage com GlnE, adenililtransferase (ATase, produto do gene *glnE*) que catalisa a desadenililação da glutamina sintetase, ativando-a (BROWN et al., 1971; KAMBEROV et al., 1995; MERRICK e EDWARDS, 1995). A glutamina sintetase desadenililada passa então a produzir glutamina (KEENER E KUSTU, 1988). Assim em baixos níveis de nitrogênio fixado, a atividade de GS é máxima e sua síntese aumentada para a captação de amônia.

Em condições de altos níveis de nitrogênio fixado, quando a relação [α -cetoglutarato/glutamina] é baixa, GlnD adquire atividade de enzima removedora de UMP, removendo este grupamento da proteína PII (ADLER et al., 1975; GARCIA e RHEE, 1983; JIANG et al., 1998a). Nestas condições, a proteína GlnD está ligada a glutamina, o que inibe sua atividade de uridililtransferase e ativa a de enzima

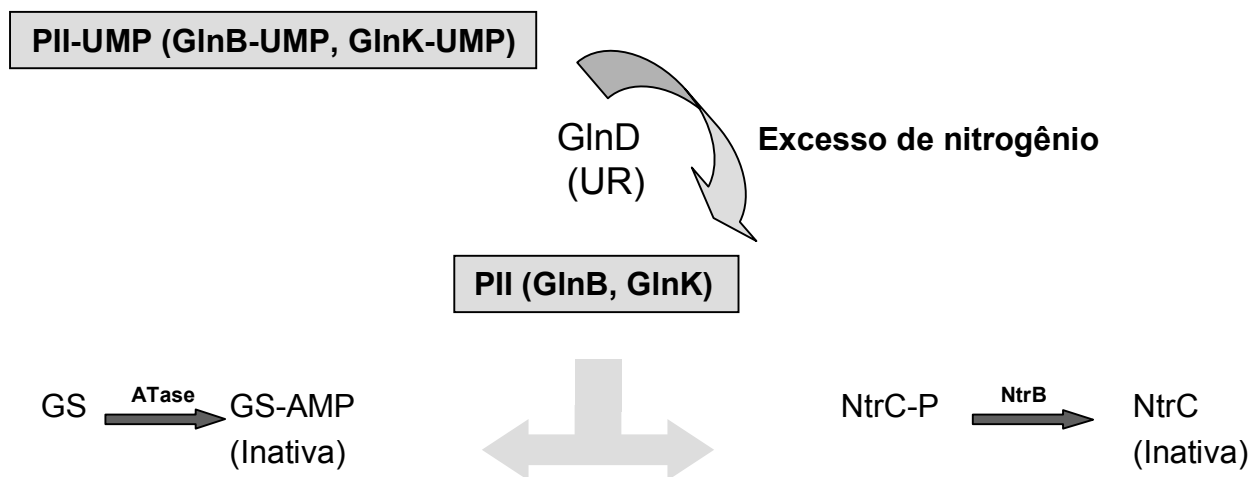
removedora de UMP, desuridilando PII-UMP (GARCIA e RHEE, 1983; de MEL et al., 1994; JIANG et al., 1998a). A proteína PII desuridilada associa-se a NtrB estimulando sua atividade de fosfatase levando a desfosforilação de NtrC-P e conseqüentemente a sua inativação. Ao mesmo tempo PII age sobre a ATase que passa a catalisar a adenililação da glutamina sintetase, inativando-a (HAWKES et al., 1985; MERRICK e EDWARDS, 1995) (Figura 1).

FIGURA 1 - REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE NTRC E DA GLUTAMINA SINTETASE EM RESPOSTA AOS NÍVEIS DE NITROGÊNIO INTRACELULAR

A) Limitação de nitrogênio (relação $[\alpha\text{-cetogluturato/glutamina}]$ alta)



B) Excesso de nitrogênio (relação $[\alpha\text{-cetogluturato/glutamina}]$ baixa)



Esquema geral da regulação do sistema Ntr pelas proteínas NtrC, NtrB, PII (GlnB e GlnK), uridililtransferase (UTase/UR), glutamina sintetase (GS) e adenililtransferase (ATase), em condições de limitantes de nitrogênio, quando a relação α cetogluturato/glutamina é elevada, e em condições de excesso de nitrogênio, quando a relação α cetogluturato/glutamina é baixa.

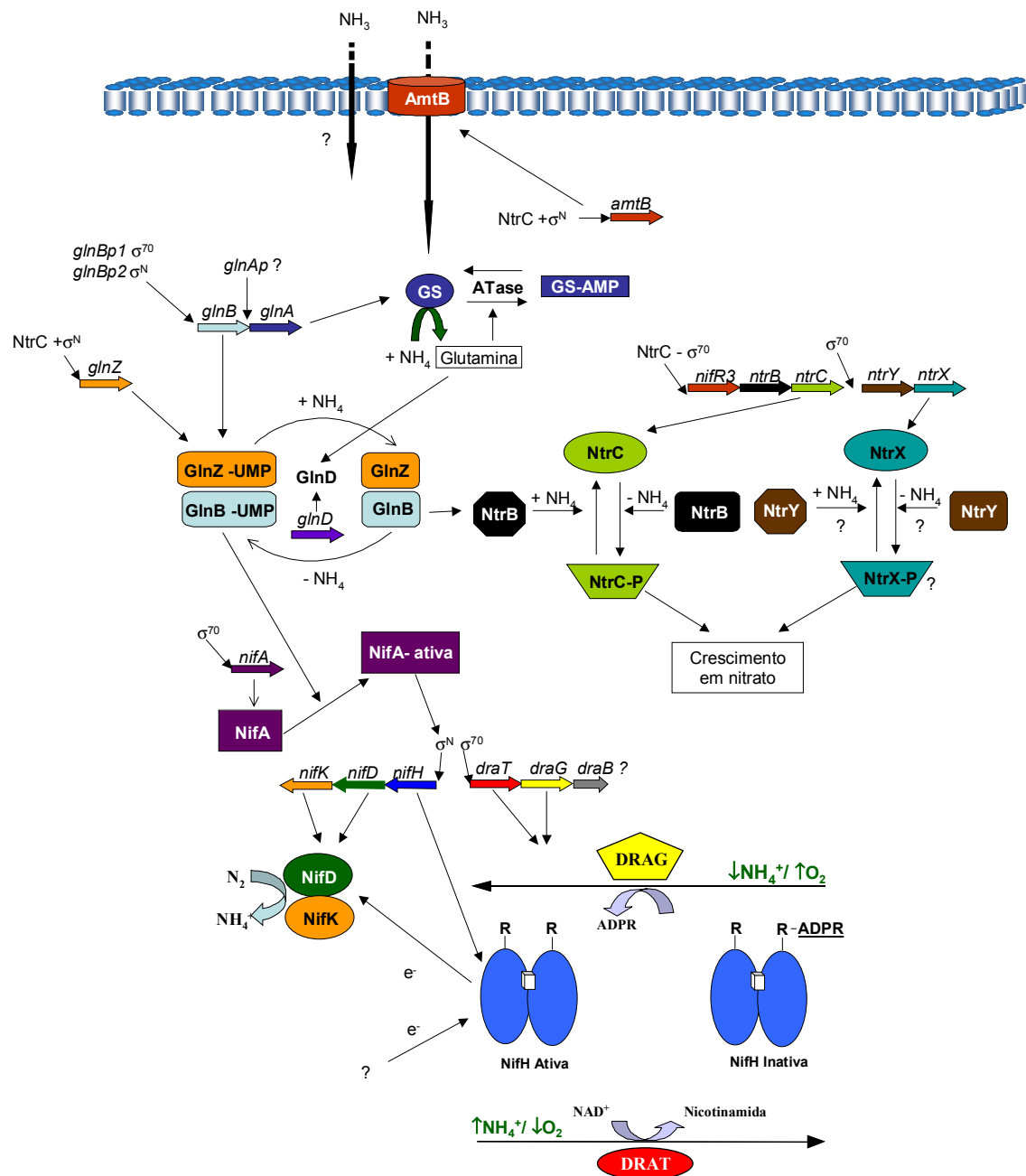
- A) Em condições de limitação de nitrogênio os níveis de glutamina intracelular são baixos. Nestas condições GlnD atua como uridililtransferase (UTase) promovendo a uridililação de GlnB e GlnK. As formas uridililadas de GlnB e GlnK não são capazes de interagir e promover a atividade fosfatásica de NtrB. Nestas condições NtrB fosforila e, conseqüentemente, ativa a proteína NtrC. GlnB e GlnK uridililadas interagem com a enzima ATase promovendo a desadenililação e, a conseqüente ativação da GS.
- B) Em condições de excesso de nitrogênio a concentração de glutamina intracelular é alta, a glutamina se liga à enzima GlnD favorecendo sua atividade de enzima removedora de uridilil (UR), como conseqüência, GlnB e GlnK são desuridililadas. GlnB e GlnK desuridililadas interagem com NtrB estimulando a desfosforilação e, conseqüentemente, inativação da proteína NtrC. GlnB e GlnK desuridililadas também interagem com ATase estimulando a inativação da GS por adenililação.

1.4.1 O sistema NTR em *Azospirillum brasilense*

O sistema ntr em *A. brasilense* parece ser mais complexo do que em bactérias entéricas devido à presença de um outro sistema de dois componentes bastante semelhante ao já conhecido sistema NtrBC. Esse sistema foi inicialmente identificado em *Azorhizobium caulinodans* e denominado NtrYX (PAWLOWSKI et al., 1991). Em *A. brasilense*, o par *ntrYX* foi identificado a jusante dos genes *ntrBC* (MACHADO et al., 1995; ISHIDA et al., 2002). É possível que a proteína NtrX, análoga da NtrC, participe na regulação da expressão do gene *nifA*, como ocorre em *A. caulinodans* (PAWLOWSKI et al., 1991; STIGTER et al., 1993). No entanto, caracterização do sistema NtrY/X revelou que essas proteínas falharam em ativar a transcrição do promotor de *nifA* em *A. brasilense* (ISHIDA et al., 2002). Apesar disso, esse sistema foi capaz de complementar um mutante de *A. brasilense* com deleção no operon *nifR3ntrBC* com relação ao crescimento dependente de nitrato, sugerindo uma possível semelhança de funções entre os pares sensores/reguladores NtrY/X e NtrB/C (ISHIDA et al., 2002). Essa função ainda não foi precisamente esclarecida devido a aparente inviabilidade de mutantes insercionais (VITORINO et al., 2001; ISHIDA et al., 2002).

Um esquema geral da cascata de interações conhecidas e supostas dentro do sistema ntr de *A. brasilense* está apresentado na Figura 2.

FIGURA 2 - SISTEMA NTR EM *Azospirillum brasilense*



Os pontos de interrogação indicam interações ou formas não comprovadas experimentalmente e sugeridas por analogia com sistemas homólogos. Modelo de regulação. (HUERGO, 2006).

1.5 PROTEÍNAS PII

Proteínas do tipo PII fazem parte do sistema Ntr, que responde aos níveis de nitrogênio fixado. Em todas as células, as vias de utilização de nitrogênio têm que ser reguladas para evitar perda desnecessária de energia e maximizar a utilização do nitrogênio disponível. Essa regulação, mesmo variando de organismo para organismo, tem nas proteínas PII um papel fundamental, principalmente na coordenação/regulação das vias do metabolismo nitrogenado.

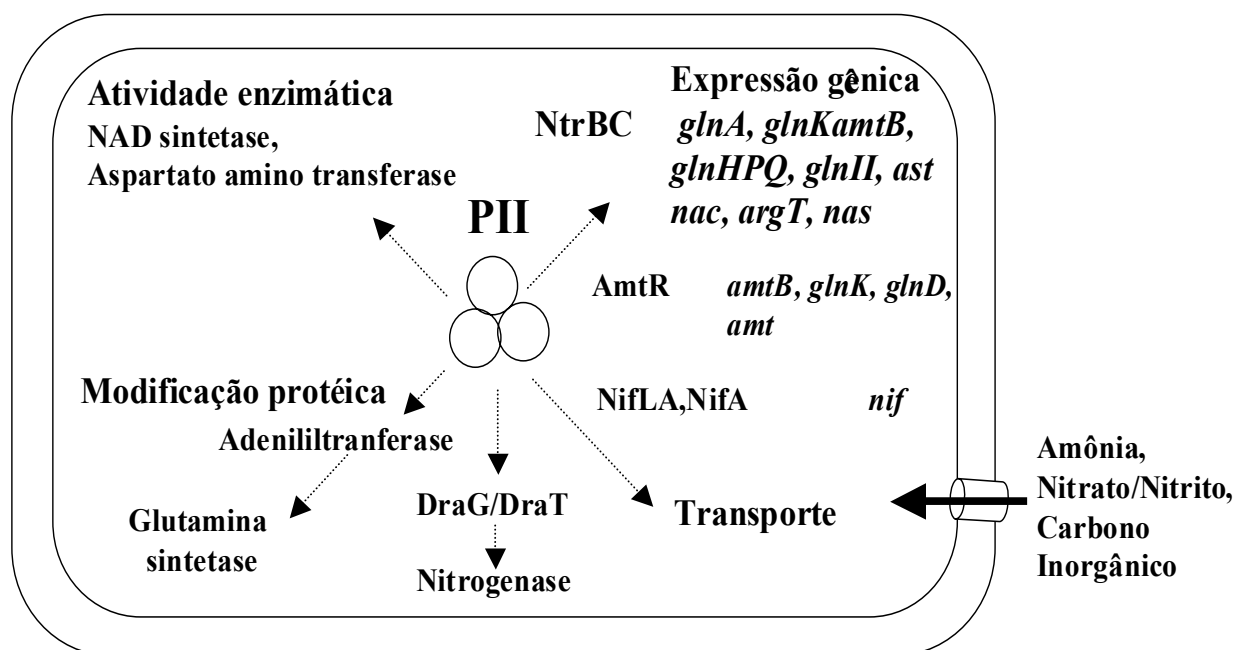
Proteínas da família PII são caracterizadas como transdutoras dos níveis de nitrogênio intracelular. Elas podem ser encontradas em todas as subdivisões das proteobactérias, firmibactérias, actinomicetos, arqueobactérias e cianobactérias. A maioria das bactérias que não possui proteínas do tipo PII são organismos patogênicos os quais passaram por um processo de redução do genoma devido ao tipo de ambiente que habitam (ARCONDEGUY et al., 2001). Recentemente proteínas da família PII foram encontradas inclusive em algas e plantas, mas até o momento não foram reportadas em fungos ou animais. Este tipo de distribuição de PII indica que esta deve ser uma das mais antigas proteínas sinalizadoras conhecidas (revisado em ARCONDEGUY et al., 2001, NINFA e ATKINSON, 2000; NINFA e JIANG, 2005).

O gene estrutural da proteína PII, *glnB*, foi clonado e seqüenciado inicialmente em *E. coli* (SON e RHEE, 1987) e *K. pneumoniae* (HOLTEL e MERRICK, 1988). Este gene é bem conservado entre os organismos, sendo que mais de 43 genes prováveis codificadores de membros da família PII já foram seqüenciados (pesquisa GenBank/NCBI, 2003) (ALTSCHUL et al., 1997). Estes genes codificam para peptídeos que possuem um resíduo de tirosina conservado utilizado para uridililação (resíduo de tirosina 51 – Tyr-51) (MERRICK e EDWARDS, 1995).

Embora a proteína PII tenha sido originalmente descoberta como consequência de estudos de fatores que controlam a atividade da GS em *E. coli* (SON e RHEE, 1987), sabe-se que ela tem um papel bastante complexo na regulação do metabolismo (revisado em NINFA e ATKINSON, 2000; ARCONDÉGUY, et al., 2001; COMMICHAU et al., 2006; LEIGH e DODSWORTH, 2007). A multiplicidade das possíveis funções para proteínas PII está

esquemáticamente representada na Figura 3 e será apresentada no decorrer do trabalho. O reconhecimento de que muitos organismos têm múltiplas proteínas PII tem ampliado o campo de estudo, e é bastante provável que existam novas funções para proteína PII ainda a serem descobertos.

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MULTIPLICIDADE POTENCIAL DE VIAS DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS PII



Essa figura mostra algumas das funções das proteínas do tipo PII e onde estas podem atuar no metabolismo celular. Essas proteínas estão relacionadas com o transporte de diversos compostos, com a regulação da expressão de inúmeros genes, com a regulação da atividade enzimática e ainda algumas modificações protéicas. (ARCONDÉGUY et al., 2001)

1.5.1 Estrutura das proteínas da família PII

A proteína GlnB de *E. coli*, como todas as proteínas da família PII até o momento caracterizadas, é uma proteína homotrimérica, e codifica um polipeptídeo de 12,4 kDa. A estrutura da proteína GlnB foi determinada inicialmente obtida com uma resolução de 2.7 Å e subseqüentemente refinada até uma resolução de 1.9 Å (CHEAH et al., 1994; de MEL et al, 1994; CARR et al., 1996) (Figura 4). Cada monômero da proteína contém duas α -hélices e seis fitas- β . As duas α -hélices e as

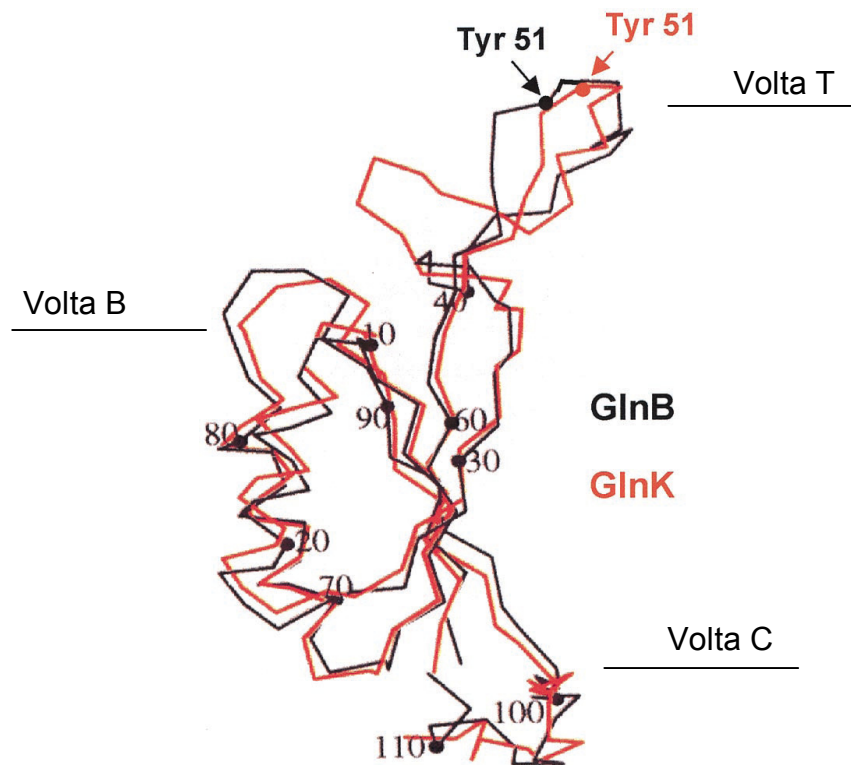
fitas- β de 1 a 4 formam um duplo motivo $\beta\alpha\beta$ conectado por uma volta que se estende do resíduo de Gly-37 ao de Phe-55. No ápice desta volta encontra-se o sítio de uridililação da proteína, resíduo de Tyr-51. Esta volta foi denominada volta T. Uma volta menor, volta B, que se estende do resíduo de Gln-82 até Asp-88, separa a segunda α -hélices da quarta fita- β . Uma terceira volta, denominada volta C, contendo as fitas- β 5 e 6 é encontrada na região C-terminal.

O trímero é arranjado de tal forma que as quatro maiores fitas- β de cada monômero sejam flanqueadas de um dos lados pela volta T do segundo monômero e do outro lado pela volta C-terminal do terceiro monômero. O arranjo dos monômeros entre si gera uma fissura que pode possuir um significado funcional, sendo alvo de importantes interações regulatórias tais como aquelas com moléculas efetoras e/ou receptores protéicos (CHEAH et al., 1994; CARR et al., 1996). XU et al (1998) identificaram por cristalografia os sítios de ligação do ATP localizados nas fissuras laterais formada entre os monômeros da proteína. As seis fitas antiparalelas das três fitas- β estão arranjadas como uma superfície côncava no centro do trímero. A maioria da proteína portanto está empacotada em um barril achatado de 30 Å de altura (Figura 5).

A estrutura da proteína GlnK de *E. coli* também foi resolvida com 2.0 Å (MACPHERSON et al., 1998; XU et al., 1998) (Figura 4). GlnK também forma um trímero, com uma estrutura central muito semelhante a GlnB. Contudo, a volta T difere significativamente de GlnB. Os resíduos 47 a 49 de GlnK formam uma hélice 3_{10} e o ápice da volta T está mais próximo ao topo do centro da molécula quando comparado com a estrutura da volta T de GlnB.

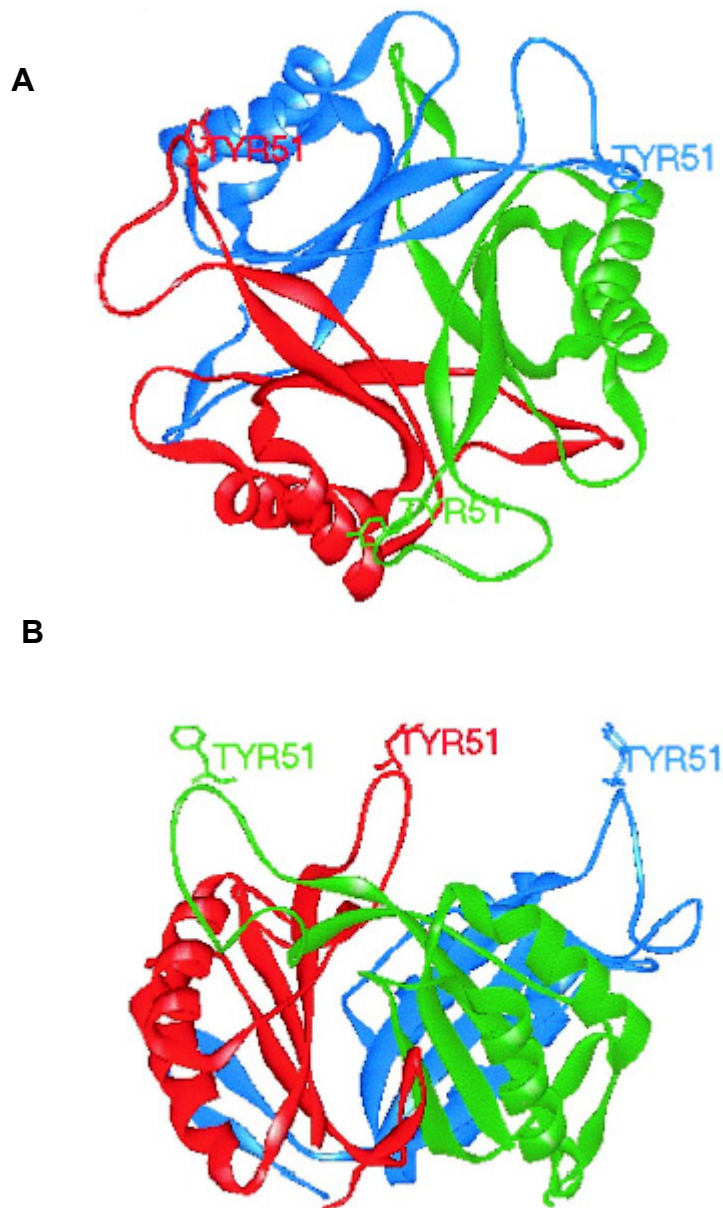
A proteína GlnB de *H. seropedicae* foi cristalizada com uma resolução de 2.1 Å e apresentou uma estrutura mais similar a GlnK do que a GlnB de *E. coli*, tendo a região das fissuras laterais de cada monômero parcialmente obstruída pela sua região C-terminal (BENELLI et al., 2002). Em contraste com a região C-terminal de *E. coli*, que contém uma fita- β , a região C-terminal da proteína PII de *H. seropedicae* possui uma hélice 3_{10} assim como a proteína GlnK de *E. coli* (BENELLI et al., 2002).

FIGURA 4 – MODELO ESTRUTURAL DO MONÔMERO DA PROTEÍNA GLNB DE *E. coli* (ARCONDÉGUY et al., 2000)



Estrutura do monômero das proteínas GlnB (preto) e GlnK (vermelho) de *E. coli*. As três voltas expostas na superfície da proteína estão indicadas na figura.

FIGURA 5 - MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA GLNB DE *E. coli* NA FORMA TRIMÉRICA



Estrutura do trîmero da proteína GlnB de *E. coli* visto de cima (Figura A) e da lateral (Figura B). Cada monômero da proteína está destacado em cores diferentes vermelho, azul e verde. O resíduo de tirosina 51 na volta T está indicado (TYR51). (ARCONDEGUY et al., 2001).

1.5.2 Proteína GlnK

Um dos genes expressos a nível secundário na cascata de regulação do metabolismo de nitrogênio em *E. coli* é o gene *glnK*, que codifica para a proteína GlnK (van HEESWIJK et al., 1996; 1995), uma paróloga de GlnB. Ao contrário do que acontece com o gene *glnB*, o qual apresenta expressão constitutiva, *glnK* está sob controle do sistema Ntr. Em *E. coli* o gene *glnK* é co-expresso com o gene *amtB*, que codifica para uma proteína transmembrana envolvida no transporte de amônio (AmtB). A presença de uma segunda proteína do tipo PII não é restrita a *E. coli*, muitos organismos apresentam duas proteínas do tipo PII, em alguns casos até 4 proteínas desta família podem ser encontradas (ARCONDENGUY et al., 2001).

Devido à alta semelhança na estrutura primária entre as proteínas GlnB e GlnK, em *E. coli* estas proteínas apresentam 67% de identidade, seria esperado que algumas das características e funções descritas para a proteína GlnB também fossem compartilhadas pela proteína GlnK. Experimentos em *E. coli* mostraram que GlnK pode compartilhar características e funções com GlnB, porém, algumas funções parecem ser restritas. GlnK parece estar especialmente projetada a funcionar sob condições limitantes de nitrogênio e, assim como GlnB, pode interagir com as proteínas NtrB e ATase (ATKINSON e NINFA, 1998, 1999). Em *K. pneumoniae*, a proteína GlnK regula a atividade da proteína NifL (HE et al., 1998; JACK et al., 1999).

A descoberta da proteína GlnK em *E. coli* ajudou a racionalizar um grande número de variações que eram observadas no modelo Ntr e explicou certos aspectos da regulação que foram observados na ausência de GlnB. Da mesma forma que GlnB, GlnK pode agir sobre a proteína NtrB e regular a concentração da proteína NtrC-P, porém, ela aparentemente é menos potente que GlnB neste controle (ATKINSON e NINFA, 1998, 1999). Em condições de depleção de nitrogênio, a proteína GlnK pode participar da regulação de promotores Ntr-dependente, que requerem uma alta concentração de NtrC-P, como, por exemplo, o promotor do gene *glnK* e *nac* de *E. coli* (FENG et al., 1995; ATKINSON et al., 2002a; BLAUWKAMP e NINFA, 2002). GlnB entretanto, em células adaptadas ao crescimento em amônia, estaria atuando no controle de promotores que requerem uma menor quantidade de NtrC, como é o caso do promotor do gene *glnA*

(BLAUWKAMP e NINFA, 2002). Estudos realizados em *E. coli* por ATKINSON et al (2002b) mostraram que GlnK substituiu GlnB em relação à regulação do operon *glnALG* quando sua expressão torna-se constitutiva enquanto que, em níveis apropriados, GlnB adquiriu a função de GlnK quando sua expressão foi alterada do seu promotor para o promotor regulador de nitrogênio de *glnK*. Estes resultados sugerem que pelo menos em *E. coli*, em alguns aspectos, a função regulatória de GlnB e GlnK em relação ao controle dos níveis de NtrC/NtrC-P é, principalmente, devida ao ajuste da expressão e acúmulo dessas proteínas (ATKINSON et al., 2002b; BLAUWKAMP e NINFA, 2002).

A proteína GlnK de *E. coli* também sofre uridililação em resposta a disponibilidade de nitrogênio assim como ocorre com GlnB (ATKINSON e NINFA, 1998). *In vitro*, a proteína GlnK é uridililada de forma um pouco menos eficiente que GlnB, sendo a desuridililação de GlnB-UMP muito mais rápida que de GlnK-UMP (ATKINSON e NINFA, 1999). GlnK, através da regulação da atividade da ATase, também pode controlar atividade de GS *in vitro*, porém, de forma menos eficiente que GlnB (ATKINSON e NINFA, 1999), sugerindo que *in vivo*, quando GlnB está presente, GlnK tem um papel secundário no controle da GS.

1.5.3 Formação de heterotrímeros entre GlnB e GlnK

Em *E. coli* as proteínas GlnB e GlnK podem formar heterotrímeros quando as células são cultivadas em meio pobre em nitrogênio, sendo que a percentagem destas espécies moleculares varia de acordo com a disponibilidade intracelular de nitrogênio (van HEESWIJK et al., 2000). Em condições limitantes de nitrogênio, quando a proteína GlnK está sendo fortemente expressa, a proteína GlnB-(UMP)₃ quase não pode ser detectada, diferentemente do que ocorre com as outras três espécies: (GlnK-UMP)₃, GlnB-UMP/(GlnK-UMP)₂ e (GlnB-UMP)₂/GlnK-UMP (van HEESWIJK et al., 2000). Experimentos de adenililação da GS *in vitro* demonstraram que heterotrímeros GlnK-GlnB totalmente uridililados estimulam a atividade de desadenililação da ATase, embora de forma menos eficiente que homotrímeros de GlnB. Já, o homotrímero de GlnK completamente uridililado não é capaz de estimular essa atividade (van HEESWIJK et al., 2000). Foi sugerido por estes autores, de acordo com os resultados encontrados *in vivo*, que a formação de

heterotrímeros possa estar relacionada com o ajuste fino no controle do sistema Ntr, onde a mistura de oligômeros de GlnB/GlnK ajustaria de forma negativa a atividade de PII-UMP em relação a desadenilação de GS (van HEESWIJK et al., 1996, 2000).

1.5.4 Papel das moléculas efetoras de PII

A interação da proteína PII com as proteínas, UTase/UR, GS e NtrB, tem sido estudada profundamente, e o mecanismo que controla essa interação está agora sendo elucidado. Em todos os casos, a interação depende dos níveis de energia, carbono e nitrogênio na célula, que são primariamente sinalizados por três moléculas efetoras: ATP, α -cetogluturato e glutamina.

Na célula, a relação glutamina/ α -cetogluturato aumenta em condições de suficiência de nitrogênio e diminui em condições de limitação (SENIOR, 1975; KUSTU et al., 1984). Conseqüentemente, foi pensado originalmente que a relação glutamina/ α -cetogluturato fosse o fator crítico no estado de uridilação de PII (MERRICK e EDWARDS, 1995). Contudo, alguns estudos *in vitro* sugerem que a concentração de α -cetogluturato na célula é sempre suficiente para promover a uridilação e desuridilação de GlnB (KAMBEROV et al, 1994, 1995), e que este não afeta a interação de GlnB com a enzima UTase/UR (GlnD) (JIANG et al., 1998c). A uridilação de GlnB requer ATP e α -cetogluturato, sendo inibida por glutamina. A desuridilação requer ATP e α -cetogluturato, porém é estimulada por glutamina (KAMBEROV et a., 1995; JIANG et al., 1998a; JIANG et al., 1998c). Portanto, pelo menos em *E. coli*, glutamina é o sinal da disponibilidade de nitrogênio e ela regula o estado de uridilação de GlnB independente de α -cetogluturato (JIANG et al., 1998a). Em *A. brasilense* e outras bactérias esse mecanismo ainda não foi bem elucidado.

O modelo atual sugere que a interação da proteína GlnB de *E. coli* com seus receptores ATase e NtrB depende primariamente do estado de uridilação de GlnB via a concentração de glutamina na célula (NINFA e JIANG, 2005). A glutamina liga se à proteína GlnD modulando sua atividade, causando a desuridilação de GlnB e, conseqüentemente, alterando a capacidade de GlnB interagir com seus receptores.

A concentração de α -cetogluturato na célula pode, no entanto, alterar a capacidade de GlnB ligar a alguns de seus receptores (NINFA e JIANG, 2005).

O principal sensor dos níveis de carbono na célula parece realmente ser o α -cetogluturato, para qual a proteína GlnB tem três sítios de ligação. A importância fisiológica do α -cetogluturato se torna clara quando a interação entre GlnB e NtrB é estudada. A proteína GlnB de *E. coli* sempre apresenta pelo menos uma molécula de α -cetogluturato ligada por trímero em condições fisiológicas (KAMBEROV et al., 1995; JIANG et al., 1998c). A ligação de mais uma molécula deste efetor diminui a afinidade dos sítios restantes, fazendo com que a proteína seja saturada com α -cetogluturato apenas em altas concentrações. (JIANG et al., 1998c; JIANG e NINFA, 1999). A proteína GlnB pode portanto existir em diferentes conformações dependendo do número de moléculas de α -cetogluturato ligadas (JIANG et al., 1998c). Em concentrações elevadas de α -cetogluturato o trímero de GlnB não uridililada é capaz de ligar mais de uma molécula de α -cetogluturato, isto reduz a afinidade de GlnB por NtrB. Nestas condições NtrB fosforila e ativa a proteína NtrC (KAMBEROV et al., 1995). Quando GlnB está saturada com α -cetogluturato, a ligação com a ATase é inibida fazendo com que a modificação da GS seja menos eficiente via GlnB, contudo GS ainda pode ser modificada por regulação alostérica da ATase ligada a glutamina (JIANG et al., 1998c). Um efeito similar do α -cetogluturato é observado na proteína GlnK. Em altas concentrações de α -cetogluturato, GlnK livre tem menor capacidade de estimular a atividade fosfatase de NtrB e de adenililtransferase da ATase (ATKINSON e NINFA, 1999).

1.5.5 Proteínas PII de *Azospirillum brasilense*

O sequenciamento da região a montante do gene *glnA* de *Azospirillum brasilense*, que codifica para enzima GS, indicou a presença de uma *orf* cujo produto apresentou alta similaridade com a proteína GlnB de *E. coli* (de ZAMAROCZY et al., 1990). O gene identificado foi denominado *glnB* e proteína por ele codificada GlnB. Esta proteína possui 12,5 kDa e é sintetizada em altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio a partir de um promotor do tipo σ^N e em baixos níveis sob condições de excesso de nitrogênio a partir de um promotor do tipo σ^{70} (de

ZAMAROCZY et al., 1990; 1993; HUERGO et al 2003). Esta proteína difere em função das proteínas PII de enterobactérias (de ZAMAROCZY et al., 1993).

Mutantes *glnB* de *A. brasilense* crescem normalmente em meio contendo amônio ou glutamina como fonte de nitrogênio, no entanto, esses mutantes apresentam um fenótipo Nif (de ZAMAROCZY et al., 1993; de ZAMAROCZY et al., 1996). Neste organismo a proteína GlnB é necessária para a atividade da proteína NifA, a ativadora de transcrição dos genes *nif* (de ZAMAROCZY et al., 1993; ARSENE et al.1996; VAN DOMMELEN et al., 2002; ARAÚJO et al., 2004) (detalhes no item 1.7.4). O mutante *glnB* de *A. brasilense* também apresenta uma redução na motilidade celular quando cultivado em meio semi-sólido independente da fonte de nitrogênio utilizada. Nesse mutante o perfil de flagelos observado é o mesmo que o da estirpe selvagem, sugerindo que a proteína GlnB tenha uma função no metabolismo energético da célula (de ZAMAROCZY et al., 1996).

Em contraste com o sistema descrito em *E. coli*, a proteína GlnB de *A. brasilense* parece não desempenhar um papel importante no controle da modificação pós-traducional da enzima GS uma vez que não é observada auxotrofia para glutamina na ausência de GlnB. Porém, a proteína GlnB parece ser necessária para a desadenililação completa da GS em condições de limitação de nitrogênio (de ZAMAROCZY et al., 1996; de ZAMAROCZY, 1998).

Utilizando oligonucleotídeos degenerados com a seqüência baseada em regiões conservadas de proteínas PII de diferentes organismos, de ZAMAROCZY e colaboradores, em 1996, identificaram, por PCR, um gene em *A. brasilense* que codifica para uma segunda proteína da família PII. Este gene foi denominado *glnZ* e seu produto, GlnZ. A transcrição desse parólogo de *glnB* de *A. brasilense* foi estudada utilizando ensaios de mRNA e fusões traducionais *glnZ-lacZ* em diferentes estirpes e identificada como sendo monocistrônica e iniciada principalmente a partir de um promotor dependente de σ^N , ativado por NtrC (de ZAMAROCZY, 1998). Ocorre um aumento de 7,5 vezes na expressão de GlnZ em células cultivadas na ausência de amônio (de ZAMAROCZY, 1998; de ZAMAROCZY et al., 1996). Embora apresente alta similaridade com GlnB, estudos fisiológicos indicam que a proteína GlnZ apresenta funções diferentes desta (de ZAMAROCZY et al., 1996; de ZAMAROCZY, 1998). Nestes estudos, o papel das proteínas GlnB e GlnZ no controle do sistema Ntr foi evidenciado. No mutante *glnB*, a expressão de *glnZ* não é

regulada por nitrogênio, indicando que GlnB é necessária para controle do sistema NtrB/NtrC. No mutante *glnZ* a expressão de *glnZ*, não é alterada em comparação com a estirpe selvagem, sugerindo que GlnZ não participa no controle da atividade das proteínas NtrB e NtrC (de ZAMAROCZY, 1998).

Diferente do que ocorre com o mutante *glnB* de *A. brasilense* que apresenta um fenótipo Nif⁻, no mutante *glnZ* a capacidade de fixar nitrogênio é idêntica a da estirpe selvagem (de ZAMAROCZY, 1998). A modificação pós-traducional da GS observada no mutante *glnZ* e duplo mutante *glnBglnZ* também é semelhante à observada na estirpe selvagem, o que sugere que nenhuma das proteínas PII tenha um papel relevante no controle da atividade da ATase (de ZAMAROCZY, 1998). O duplo mutante *glnBglnZ* ainda apresenta deficiência de crescimento tanto em meio rico quanto mínimo. Este fenótipo pode ser complementado com o gene *glnB* ou com o gene *glnZ*, indicando que a presença de uma das proteínas PII seja essencial para o crescimento celular (de ZAMAROCZY, 1998).

Por último, a proteína GlnZ também está relacionada com o transportador de íons amônio em *A. brasilense*. Em 1998, de ZAMAROCZY e colaboradores observaram que mutantes *glnZ* possuem taxa de transporte de amônio maior que a estirpe selvagem, e que quando GlnZ é superexpressa, essa taxa diminui. O mutante *glnZ* não apresenta reativação da nitrogenase após a adição de amônio ao meio de cultura, sugerindo que a proteína GlnZ esteja envolvida no controle pós-traducional de regulação da nitrogenase provavelmente controlando a atividade da enzima DraG por um mecanismo até pouco tempo totalmente desconhecido (item 1.8) (KLASSEN et al., 2001, HUERGO et al., 2005). Esses autores também propõem o envolvimento da proteína GlnB com a atividade da enzima DraT. Estudos mais recentes mostraram que de fato a proteína DraG liga-se diretamente a GlnZ tanto na forma uridililada quanto desuridililada e que DraT liga-se a GlnB somente quando está se encontra na forma desuridililada (HUERGO et al., 2006). Este mesmo autor mostrou também que DraG é seqüestrada para a membrana da célula de uma forma dependente de AmtB e GlnZ havendo a reconstituição *in vitro* de um complexo ternário entre estas proteínas (HUERGO et al., 2007).

1.6 PROTEÍNA GLND

Em muitas bactérias a enzima uridililtransferase/enzima removedora de uridilil, produto do gene *glnD*, tem sido descrita como um regulador chave no controle do metabolismo do nitrogênio. O primeiro gene *glnD* foi identificado em enterobactérias e no diazotrofo *Azotobacter vinelandii* (CONTRERAS et al., 1991, van HEESWIJK et al., 1992). Em contraste com a situação observada em enterobactérias, mutação no gene *glnD* de *A. vinelandii* não tem efeito no sistema geral de regulação do nitrogênio (Ntr). Mutantes *glnD* de *A. vinelandii* são, contudo, incapazes de fixar nitrogênio (CONTRERAS et al; 1991 COLNAGHI et al; 2001). Estas características diferem das encontradas nos mutantes *glnD* de *Rhizobium tropici* e *R. leguminosarum*, que apresentam um fenótipo selvagem para fixação de nitrogênio, mas têm o sistema de regulação global do nitrogênio alterado (O'CONNELL et al; 1998 a e b, SCHLÜTER et al; 2000).

Em *A. brasilense*, o gene *glnD* foi isolado em um banco de mutantes cromossomais obtidos com a inserção do transposon Tn5-B30 durante a busca de fenótipos negativos para transporte de metilamônio e crescimento em nitrato (VAN DOMMELEN et al., 2002). O fenótipo do mutante *glnD* está relacionado com o papel de GlnD no controle do sistema *ntr* através da modificação das proteínas PII, GlnB e GlnZ. A expressão dos genes *amtB*, que codifica para o transportador de amônio/metilamônio e *nasB*, que codifica para a enzima assimilatória nitrato redutase, estão sob o controle do sistema Ntr. Na ausência de GlnD, GlnB não é uridililada em limitação de nitrogênio, levando à desfosforilação constitutiva da proteína NtrC e, conseqüentemente, desabilitando a expressão dos genes *amtB* e *nasB*. Ao contrário do que ocorre em enterobactérias, o mutante *glnD* de *A. brasilense* não é auxotrófico para glutamina, sugerindo que GlnD não seja necessária para o controle da atividade da enzima GS. Entretanto, em condições limitantes de nitrogênio, GlnD é necessária para a desadenililação completa da GS (VAN DOMMELEN et al., 2002). Em *A. brasilense*, o gene *glnD* também é essencial para a atividade da nitrogenase (VAN DOMMELEN et al., 2002). Pouco se sabe a respeito da regulação da expressão do gene *glnD*. Sua expressão é aumentada em células sujeitas a limitação de nitrogênio, porém esta regulação é apenas

parcialmente dependente do sistema Ntr. Nenhuma região promotora ou seqüência regulatória foi sugerida para este gene (VAN DOMMELEN et al., 2002).

1.6.1 Uridililação das proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense*

ZAMAROCZY e colaboradores (1996, 1998) mostraram *in vivo* que as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* são marcadas com uracil tritiado ([³H]-UMP) quando as células são submetidas a condições limitantes de nitrogênio fixado. Nenhuma marcação é observada em células cultivadas na presença de amônio (de ZAMAROCZY et al., 1996; de ZAMAROCZY, 1998). Isto levou conclusão de que as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* são uridililadas em condições de limitação de nitrogênio de forma semelhante ao descrito para as proteínas PII de *E. coli* (ATIKINSON et al 1998, 1999).

Ensaio preliminares *in vitro* com as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* indicam que ambas são uridililadas pela proteína GlnD de *E. coli* parcialmente purificada na presença de ATP e α -cetoglutarato, sendo esta uridililação inibida por glutamina. Nesses mesmos ensaios, a reação de desuridililação foi estimulada na presença desse último composto (ARAUJO et al., 2004; ARAÚJO, et al., 2005). Até o momento nada se sabe a respeito da uridililação *in vitro* dessas proteínas pela proteína GlnD de *A. brasilense*.

1.7. REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO

1.7.1 Regulação da expressão dos genes *nif*

Os promotores reconhecidos pela σ^N RNA polimerase holoenzima apresentam resíduos conservados nas regiões -24 e -12 em relação ao local de início de transcrição. A seqüência consenso para estes promotores é Y₇₂T₈₃G₉₉G₁₀₀C₇₄A₇₂C₆₅G₅₅ – N₄ – T₇₃T₇₉G₉₉C₉₂W₈₇, onde Y indica pirimidinas e W indica A ou T e os subscritos, a freqüência de ocorrência da base neste grupo de promotores (BARRIOS et al., 1999). A transcrição dos genes *nif* ocorre a partir desses promotores -25/-24 e -13/-12 (MERRICK e CHAMBERS, 1992; FISCHER,

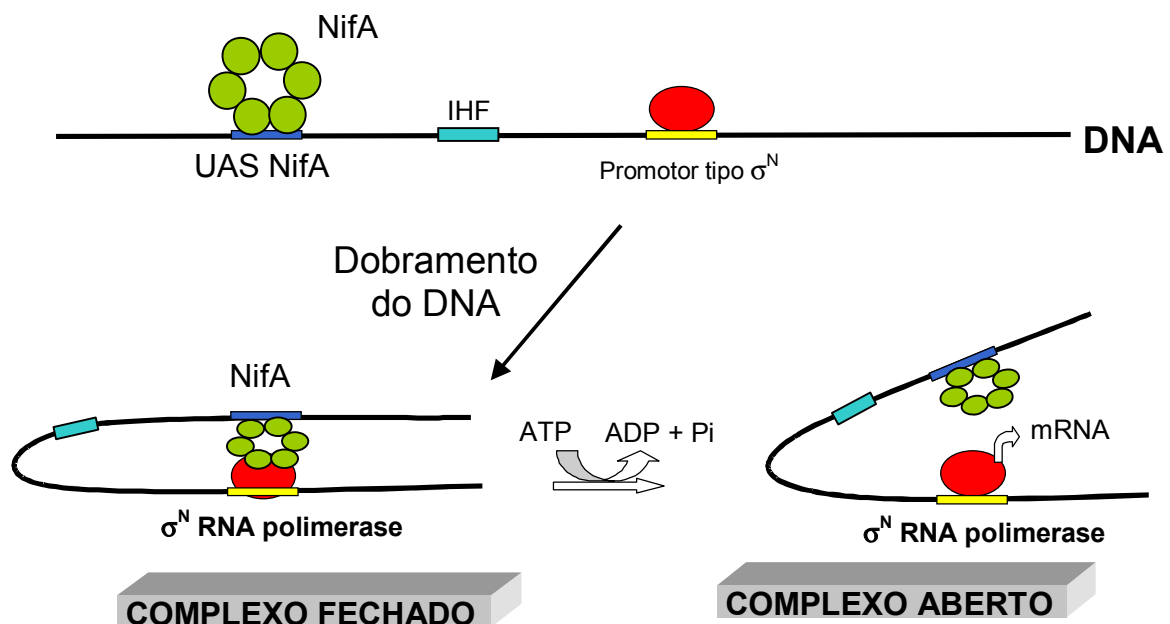
1994) sendo que, estes devem ser reconhecidos pelo fator σ^{54} ou σ^N da RNA polimerase (HUNT e MAGASANIK, 1985; KUSTU et al., 1989; MERRICK, 1993) e requerem a presença de uma proteína ativadora. A σ^N RNA polimerase holoenzima liga-se à região promotora formando um complexo fechado que é incapaz de se isomerizar em complexo aberto na ausência desse ativador. A proteína ativadora atua como um efetor positivo da transcrição de promotores σ^N e sua atividade é controlada por sinais fisiológicos que determinam sua ligação a seqüências conservadas UAS (do inglês “*upstream activator sequence*”), as quais normalmente encontram-se 100 pb a montante do promotor (MERRICK, 1993) (Figura 6). A interação da RNA polimerase com a proteína ativadora requer a formação de dobras no DNA que separa as duas proteínas; esta curvatura é, em alguns casos, mediada pela proteína IHF (MERRICK, 1993) ou por seqüências de A e T presentes no DNA (CHEEMA et al., 1999; WOSTEN, 1998) (Figura 6).

A proteína ativadora NifA, uma proteína de ativação da família das EBP, “enhancer binding protein”, atua em conjunto com a RNA polimerase- σ^N para catalisar a formação do complexo aberto para início da transcrição (SANTERO, 1989; AUSTIN et al., 1990) (Figura 6). Ela se liga a regiões conservadas UAS com o consenso TGT – N₁₀ – ACA (BUCK et al., 1986) cerca de 100pb a montante da região promotora σ^N e contacta a σ^N RNA polimerase através de uma dobra na molécula de DNA. A formação do complexo aberto e subsequente início de transcrição requer a hidrólise de ATP catalisada por NifA (AUSTIN et al., 1990). Em todos os diazotrofos estudados, a fixação de nitrogênio é regulada principalmente a nível transcricional. Esse controle é mediado pela regulação da expressão e atividade da proteína NifA em resposta ao oxigênio e nitrogênio fixado (MERRICK, 1993).

A regulação da expressão do gene *nifA* envolve um mecanismo que varia consideravelmente nos vários diazotrofos. Em *K. pneumoniae*, o gene *nifA* forma um operon com o gene *nifL*, cujo produto, a proteína NifL, tem função antiativadora (MERRICK et al., 1982). A expressão do operon *nifLA* ocorre em baixos níveis de íons amônio e necessita do fator σ^N e da proteína ativadora de transcrição NtrC na forma fosforilada (MERRICK e CHAMBERS, 1992; MERRICK, 1993). Em *Herbaspirillum seropedicae*, assim como em *K. pneumoniae*, transcrição de *nifA* é

dependente de σ^N e NtrC (SOUZA et al., 1991, WASSEM et al., 2002). Já em *A. brasilense*, a transcrição de *nifA* é independente de NtrC (LIANG et al., 1991a, 1993; FADEL-PICHETH et al., 1999) (detalhes item, 1.7.2). No diazotrofo *Azorhizobium caulinodans* a expressão de *nifA* é regulada de acordo com os níveis de oxigênio e íons amônio (RATET et al., 1989).

FIGURA 6 - MODELO DA ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS GENES *nif*



A proteína NifA ativa se liga a sítios UAS no DNA a montante da região promotora tipo σ^N contata a σ^N RNA polimerase holoenzima através de uma dobra no DNA. Esta proteína promove a hidrólise de ATP permitindo a abertura da dupla fita de DNA pela σ^N – RNA polimerase holoenzima que inicia a síntese de RNA mensageiro. (ADAPTADO de HUERGO, 2006).

1.7.2 Regulação da fixação de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*

A expressão dos genes de regulação do metabolismo de nitrogênio em *A. brasilense*, semelhante ao que ocorre em outros diazotrofos, está sob o controle de fatores ambientais como fonte de nitrogênio e concentração de oxigênio

(DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). Neste organismo, a transcrição dos genes *nif* também é dependente de NifA (PEDROSA e YATES, 1984; SINGH et al., 1989; LIANG et al., 1991a; VANDE BROEK et al., 1992; FANCELLI et al., 1994).

Análise da região promotora do gene *nifA* de *A. brasilense* sugere que a sua transcrição, embora estimulada na ausência de amônia, é independente de NtrC (LIANG et al., 1991a, 1993; FADEL-PICHETH et al., 1999). A caracterização da região promotora do gene *nifA* de *A. brasilense* por FADEL-PICHETH et al (1999) indicou um promotor do tipo σ^{70} como provável promotor do gene *nifA* e que a repressão máxima deste gene depende do efeito combinado entre amônio e oxigênio.

Em *A. brasilense*, o controle por amônia parece envolver o domínio N-terminal de NifA uma vez que a deleção deste domínio gera uma proteína ativa independente dos níveis de amônia. Em 1996, ARSENE et al sugeriram que talvez a proteína GlnB esteja envolvida no controle por amônia e provavelmente interaja com o domínio N-terminal de NifA (detalhes item 1.7.4).

1.7.3 Proteína NifA

Praticamente todas as proteínas NifA conhecidas, assim como NtrC, têm três domínios estruturais típicos de ativadores de transcrição dependentes de σ^{54} (DRUMMOND et al., 1986; MORETT e SEGOVIA, 1993). O domínio carboxi-terminal, com cerca de 50 resíduos, contém um motivo conservado em hélice-volta-hélice que é envolvido na ligação ao DNA (MORETT et al., 1988; MISSAILLIDIS et al., 1999; MONTEIRO et al., 2003). O domínio central, com cerca de 240 resíduos, contém um sítio de ligação para o ATP e para a interação com o fator σ^{54} (MORETT e SEGOVIA, 1993; GONZALEZ et al., 1998). O domínio N-terminal apresenta menor similaridade entre as espécies e está relacionado com controle da atividade de NifA frente ao nitrogênio fixado. A região N-terminal da proteína NifA compreende um domínio GAF, um motivo sinalizador encontrado em varias proteínas sensoras e sinalizadoras (ARAVIND e PONTING, 1997; HO et al., 2000). Este domínio é capaz de ligar pequenas moléculas como GMPc (HO et al., 2000; KANACHER et al., 2002) e, recentemente, foi mostrado por LITTLE e DIXON (2003) que a ligação do cofator

α -cetogluturato à proteína NifA de *A. vinelandii* é uma propriedade do seu domínio GAF isolado. Esses mesmos autores também sugerem que a ligação do α -cetogluturato no domínio GAF da proteína NifA possa levar a mudanças conformacionais na proteína, tornando-a capaz de resistir a inibição por NifL (REYES-RAMIREZ et al., 2002; LITTLE e DIXON, 2003).

Em *Azotobacter vinelandii*, *Enterobacter agglomerans* e *K. pneumoniae* a atividade da proteína NifA é inibida pela proteína NifL em resposta a altas concentrações de oxigênio ou amônia (DIXON et al., 1977, HILL et al., 1981; MERRICK et al., 1982; REYES-RAMIREZ et al., 2002). O controle de NifA pela proteína NifL em *K. pneumoniae*, assim como em *A. vinelandii* é dependente da proteína paróloga de GlnB, GlnK (HE et al., 1998; JACK et al., 1999; REYES-RAMIREZ et al., 2001; LITTLE et al., 2000, 2002) (detalhes item 1.7.4).

A. brasilense, *Herbaspirillum seropedicae*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhodobacter capsulatus* não possuem a proteína NifL. Nesses organismos é a própria proteína NifA que sofre alterações em resposta a variação dos níveis de oxigênio e amônia, sendo que a proteína PII é requerida neste último caso (FISCHER e HENNECKE, 1987; FISCHER et al., 1988; MASEPOHL et al., 1988; ARSÉNE et al., 1996, ARAÚJO et al., 2004, NOINDORF et al., 2006) (ver item 1.7.4). A sensibilidade de NifA frente ao oxigênio parece ser devido a um motivo contendo cisteínas localizado na porção C-terminal da proteína.

Apesar da NifA apresentar similaridade com a proteína NtrC ela não é uma proteína clássica da família de reguladores de resposta de sistemas de dois componentes. O domínio N-terminal não possui o resíduo de aspartato conservado que é o sítio de fosforilação em proteínas reguladoras de resposta como NtrC, não existe nenhuma evidência de que NifA seja fosforilada em qualquer condição. Apesar das diferenças com a família de proteínas de sistemas de dois componentes, o domínio N-terminal da proteína NifA constituiu um módulo regulatório e tem um importante papel no controle da ativação transcricional (MERRICK, 2004).

1.7.4 Envolvimento da proteína PII no controle da atividade de NifA

Enquanto que o papel da proteína PII é de alguma forma variável em relação à regulação da expressão do gene *nifA*, uma função bem mais consistente está emergindo com relação à regulação da atividade da proteína NifA. Neste contexto, a informação vem de estudos com *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhodospirillum rubrum* e *Azorhizobium caulinodans* (Citado em ARCONDÉGUY et al., 2001).

A primeira indicação de que proteínas do tipo PII poderiam estar envolvidas na regulação da atividade da proteína NifA veio de uma observação em *A. brasilense* onde mutantes *glnB* eram Nif⁻ (LIANG et al., 1992), enquanto que mutantes *glnZ* eram Nif⁺ (de ZAMAROCZY, 1998). Como os mutantes *glnB* não afetavam a expressão de *nifA*, foi postulado que GlnB provavelmente fosse necessária para ativar NifA, pela prevenção do efeito inibitório de seu domínio N-terminal (ARSÉNE et al., 1996). A proteína NifA de *A. brasilense* foi capaz de ativar a expressão de uma fusão *nifH-lacZ* em *E. coli* apenas quando a proteína GlnB de *A. brasilense* estava presente (ARAÚJO et al., 2004). Várias deleções da região N-terminal de NifA foram construídas e a atividade da nitrogenase foi restaurada quando as formas N-truncadas de NifA foram inseridas em um mutante *nifA*, indicando que a porção N-terminal não é essencial para sua atividade (ARSENE et al., 1996). As formas N-truncadas de NifA também são capazes de restaurar o fenótipo Nif no mutante *glnB*. Estes dados levaram a formulação da hipótese de que em *A. brasilense* a região N-terminal de NifA inibe a atividade da proteína em condições de excesso de nitrogênio e que em condições de fixação de nitrogênio, GlnB-UMP se ligaria à NifA removendo o efeito inibitório do domínio N-terminal. Dados posteriores, onde mutantes *glnD* de *A. brasilense* ou células expressando uma forma mutante de GlnB não passível de ser uridililada (GlnB Y51F) apresentaram um fenótipo Nif⁻ sugerindo que a uridililação de GlnB seja necessária para ativar a proteína NifA (VAN DOMMELEN et al., 2002; ARSENE et al., 1999) corroboraram com esta hipótese. O mesmo trabalho, realizado por ARSÉNE et al. (1999) mostrou que uma mutação em um único resíduo de tirosina 18 do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* resultou numa proteína ativa que não requer PII para sua atividade em condições de fixação de nitrogênio. Recentemente foi demonstrado, através de um

sistema de duplo híbrido, que a proteína GlnB se liga diretamente à região N-terminal de NifA de *A. brasilense* (CHEN et al., 2005).

Situação semelhante à de *A. brasilense* também ocorre em *H. seropedicae*, onde mutantes *glnK* são Nif⁻ (NOINDORF et al., 2006), enquanto que a expressão de *nifA*, que é NtrC dependente, seria esperada ser constitutiva nesta situação (BENELLI, 1997; WASSEM et al., 2000). Estudos *in vivo* da proteína NifA de *H. seropedicae* mostram que ela, quando expressa em *A. brasilense* é ativa somente na ausência de amônia, mas é inativa quando expressa em *E. coli* nas mesmas condições (SOUZA et al., 1999). Comparativamente, a forma amino-terminal truncada de NifA permanece ativa na presença de amônia em *A. brasilense* e *E. coli* (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999a), indicando que o domínio N-terminal esteja envolvido no controle de nitrogênio. Além disso, quando expresso *in trans* em *E. coli*, este domínio pode inibir a atividade da proteína NifA truncada (MONTEIRO et al., 1999b). Se a proteína PII estiver interagindo com o domínio N-terminal, então a inativação da proteína NifA de *H. seropedicae* em *E. coli* poderia ser devida à ausência de uma proteína cognata a PII.

Considerando que estudos preliminares em *K. pneumoniae* indicavam que nem *glnB* ou *glnD* atuava diretamente na regulação da atividade NifA mediada por NifL (citado em EDWARDS e MERRICK, 1995) foi sugerida a participação do produto do gene *glnK* nessa função (van HEESWIJK et al., 1996). Estudos realizados por HE et al. (1997) indicando que a desrepressão da atividade NifA é dependente de NtrC sugeriram participação da proteína GlnK. Estudos em *E. coli* e *K. pneumoniae* indicam que a interação de NifL-NifA de *K. pneumoniae* é de fato modulada pela presença de GlnK de tal forma que, em condições limitantes de nitrogênio, GlnK é necessária para o efeito inibitório de NifL em NifA (HE et al., 1998; JACK et al., 1999). Em um duplo mutante *glnBglnK* de *E. coli*, a modulação da atividade NifA por NifL é dependente da concentração de GlnK, sendo que, quando superexpressa em níveis não fisiológicos, a proteína GlnB pode substituí-la (ARCONDÉGUY et al., 1999). Um estudo de mutagênese sítio-dirigida do gene *glnB* mostrou que o resíduo 54, localizado na volta T, é o mais importante no contexto de regulação da atividade de NifA. Além disso, uma combinação de somente duas mutações, nos resíduos 43 e 54, permitem que a proteína GlnB funcione como GlnK e alivie completamente a inibição de NifL sobre NifA (ARCONDÉGUY et al 2000).

Em *A. vinelandii* foi demonstrado, através de sistemas de duplo híbrido em levedura, que GlnK interage com NifL de tal forma que no modelo de regulação da atividade de NifA, a proteína GlnK na sua forma não uridililada estimula o efeito inibitório de NifL sobre NifA. Já, na forma uridililada, em resposta a limitações de nitrogênio, GlnK previne a inibição de NifA (RUDNICK et al., 2002; LITTLE et al., 2000, 2002). Este modelo é distinto do proposto em *K. pneumoniae*, onde a proteína GlnK não modificada alivia o efeito inibitório de NifL ao invés de estimulá-lo. LITTLE et al. (2002) demonstraram que em *A. vinelandii*, GlnK não uridililada interage diretamente com o domínio C-terminal de NifL de uma forma dependente de Mg^{+2} , ATP e 2-oxoglutarato.

1.8. REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA NITROGENASE

Em um grande número de diazotrofos, a atividade da nitrogenase pode ser regulada por ADP-ribosilação reversível da proteína Fe. Essa regulação ocorre em resposta a adição de amônio ao meio, condições anaeróbicas ou, devido à queda da luminosidade (em bactérias fotossintetizantes) (MERRICK e EDWARDS, 1995). Este mecanismo envolve as enzimas DraT (dinitrogenase ADP-ribosil transferase), que ADP ribosila a proteína Fe inativando o complexo, e DraG (dinitrogenase redutase glicohidrolase) que remove o grupo ADP-ribose ativando a nitrogenase (ZHANG et al., 1995, 1997). Este fenômeno é conhecido como “switch-off/switch-on”, desligamento e religamento, da nitrogenase (ZUMFT e CASTILLO, 1978).

Várias bactérias diazotróficas, incluindo *R. rubrum*, *R. capsulatus*, *A. brasilense* e *A. lipoferum* podem regular a atividade de nitrogenase por ADP-ribosilação em resposta a amônia, limitação de energia e anaerobiose (HARTMANN e BURRIS, 1987; FU e BURRIS, 1989; LIANG et al., 1991b; LUDDEN, 1994; LUDDEN et al., 1989; ZHANG et al., 1993, 1994, 1997). Entretanto, o sinal metabólico que controla a atividade das proteínas DraT/DraG desencadeando o mecanismo de ADP-ribosilação ainda não está bem elucidado (ZHANG et al., 1997).

As proteínas DraT e DraG mantêm sua atividade em extrato celular, o que sugere que suas atividades sejam reguladas por efetores que se ligam fracamente a estas enzimas. Acredita-se que as proteínas DraT e DraG sejam ativadas e

desativadas em momentos distintos durante o fenômeno de desligamento/religamento da nitrogenase.

O sistema DraT e DraG além de responder a presença de íons amônio também responde a mudanças no estado energético celular (ZHANG et al., 1993). Em *A. brasilense* e *Azoarcus* sp. a proteína NifH sofre ADP-ribosilação em resposta a anaerobiose e em *R. capsulatus* e *R. rubrum* em resposta à queda da luminosidade (HARTMANN et al., 1986; LOWERY et al., 1986; MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002). Vários trabalhos sugerem que a glutamina é o sinal que desencadeia o desligamento da nitrogenase em resposta à adição de amônio ao meio, porém a glutamina não parece estar envolvida no desligamento em resposta a anaerobiose e falta de luminosidade (ZHANG et al., 1997; NORDLUND, 2000).

Em 2001, ZHANG et al. mostraram que em *R. rubrum* a atividade de DraT não é afetada em mutantes GlnK, enquanto que a regulação da atividade de DraG é completamente abolida, e esta permanece ativa mesmo após a adição de amônia. Estes resultados sugerem que GlnB e GlnK têm um papel importante na regulação do sistema DraT-DraG.

Em *A. brasilense* a proteína GlnZ é necessária para reativação da nitrogenase após o seu desligamento por amônio. No entanto, ela parece não participar no sistema de ADP-ribosilação da proteína ferro em resposta a este composto (KLASSEN et al., 2001), neste caso, é a proteína GlnB que está envolvida no processo. Em trabalhos mais recentes foi comprovado que GlnB, somente na forma não uridililada, é capaz de regular DraT interagindo diretamente com esta; e que GlnZ, tanto na forma livre quanto uridililada, é capaz de interagir e ligar diretamente a DraG (HUERGO et al., 2006). Este mesmo autor mostrou que DraG é seqüestrada a membrana da célula de uma forma dependente de GlnZ e AmtB e que estas três proteínas reconstituem um complexo ternário *in vitro* (HUERGO et al., 2007).

2 JUSTIFICATIVA

As proteínas PII (GlnB e GlnZ), GlnD e NifA possuem um papel fundamental no controle da fixação biológica do nitrogênio. Resultados preliminares obtidos por ARAÚJO, L. M. (2003) mostraram que GlnB é fundamental para o controle da atividade de NifA em resposta a amônio, provavelmente através de uma interação direta proteína-proteína. Esta regulação aparentemente não envolvia GlnZ. Análise *in vitro* da uridililação de PII foram realizados anteriormente utilizando a proteína GlnD de *E. coli* (ARAÚJO et al., 2004, ARAÚJO L. M. 2003). Com a identificação do gene *glnD* de *A. brasilense*, a caracterização da atividade da proteína pode ser realizada. Desta forma, a caracterização da uridililação de PII por GlnD de *A. brasilense* e ensaios de interação proteína-proteína PII e NifA poderiam fornecer maiores informações sobre a regulação da fixação de nitrogênio e do metabolismo nitrogenado no diazotrofo *A. brasilense*.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudo das interações entre as proteínas PII, GlnB e GlnZ, com as proteínas GlnD e NifA de *Azospirillum brasilense*.

Objetivos específicos:

- Purificação das proteínas GlnB e GlnZ nativas de *A. brasilense*, a partir da expressão em *E. coli*;
- Clonagem, expressão e purificação da proteína NifA de *Azospirillum brasilense* inteira e do seu domínio N-terminal;
- Estudo e caracterização *in vitro* da interação das proteínas NifA e PII;
- Expressão e purificação da proteína GlnD-His de *Azospirillum brasilense*;
- Caracterização bioquímica da proteína GlnD-His com ênfase no estudo de uridililação e desuridililação das proteínas PII de *Azospirillum brasilense*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizadas neste trabalho estão listadas nas tabelas 01 e 02.

TABELA 01 - ESTIRPES DE BACTÉRIAS

<i>Escherichia coli</i>	Característica	Referência/Fonte
BL21 (λ DE3) <i>pLysS</i>	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ <i>clts</i> 857 <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7</i> gene 1) (produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs).	SAMBROOK et al., 1989
BL21(λ DE3) <i>codonplus</i>	<i>F-dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> (λ DE3).	Stratagene
RosettaBlue (DE3) <i>pLysS</i>	<i>endA1 hsdR17</i> (rK12- mK12+) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac pLysS</i> RARE2.	Novagen
C41 (λ DE3)	<i>ompT hsdS</i> (<i>r_B m_B</i>) <i>gal</i> (λ DE3)	MIROUX e WALKER, 1996
C43 (λ DE3)	<i>ompT hsdS</i> (<i>r_B m_B</i>) <i>gal</i> (λ DE3) duplo mutante, derivado da C41 contendo subunidade b e c da F-ATPase (DE3).	MIROUX e WALKER, 1996
BL21AI	<i>F- ompT hsdSB</i> (<i>r_B-m_B-</i>) <i>gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i> .	Invitrogen
DH10B	<i>F'</i> [<i>proAB</i> ⁺ , <i>lacZ</i> Δ M15], <i>Nal</i> ^R .	SAMBROOK et al., 1989
RB9065	<i>glnB2306, glnD99::Tn10</i> , <i>Tc</i> ^R .	BUENO et al., 1985
RB9065 (λ DE3)	RB9065 produtora de T7 RNA polimerase.	BENELLI, 1997
S17.1	<i>Sm</i> ^r <i>Tra</i> ⁺	SIMON et al., 1983
XL1-Blue	<i>lacF'</i> [<i>traD36, proAB</i> ⁺ , <i>lacIq, lacZ</i> Δ , M15Tn10 (<i>tet</i> ^R)].	SAMBROOK et al., 1989
YMC10	Δ <i>lacU169, endA1, thi-1, hsdR17, supE44</i> .	BACKMAN et al., 1981
<i>A. brasilense</i>		
FP2	Sp7 (ATCC 29145) <i>Nif</i> ⁺ , <i>Nal</i> ^R , <i>Sm</i> ^R .	PEDROSA e YATES (1984)
7628	<i>Nal</i> ^R <i>Km</i> ^R <i>Nif glnB::km</i>	de ZAMAROCZY et al., 1996
7611	<i>Nal</i> ^R <i>Sm</i> ^R <i>Nif</i> ⁺ <i>glnZ::W</i>	de ZAMAROCZY et al., 1998
LFH2	<i>Nal</i> ^R <i>Km</i> ^R <i>Apra</i> ^r estirpe merodiplóide <i>glnB::km</i> +	HUERGO, 2006

glnB::scar

LFH3	Nal ^R Nif estirpe derivada de LFH2 Δ <i>glnB</i>	HUERGO, 2006
------	--	--------------

TABELA 02 - PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Característica	Referência/Fonte
pALIpGT	Contém o gene <i>glnD</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pET28a (<i>NdeI/HindIII</i>).	INVITTI, 2004
pCR2.1	Vetor de clonagem/ promotor <i>lac</i> . Km ^R Amp ^R .	Invitrogen
PDK5	vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> Amp ^R	KLEINER et al., 1988
pDK6	vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> Km ^R	KLEINER et al., 1988
pDK7	Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> Cm ^R .	KLEINER et al., 1988
pET28a	Vetor de expressão/ promotor T7. Gera proteína de fusão com His-Tag. Km ^R	Novagen
pLANTTA	Contém a região N-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pCR2.1.	Este trabalho
pLANTDK7	Contém a região N-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pDK7 (<i>XbaI/HindIII</i>).	Este trabalho
pLANTpET	Contém a região N-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pET28a (<i>NdeI/HindIII</i>).	Este trabalho
pLANTDK7MP	Contém o plasmídeo pLAeNTDK7 clonado no vetor pMP220.	Este trabalho
pLAeNTDK7	Contém a região N-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pDK7 (<i>XbaI/HindIII</i>). Em fase correta de leitura.	Este trabalho
pLANifApET	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pET28a (<i>NdeI/HindIII</i>).	Este trabalho
pLAenifADK7	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pDK7 (<i>XbaI/HindIII</i>). Em fase de leitura.	Este trabalho
pLANifADK7MP	Contém o plasmídeo pLAenifADK7 clonado no vetor pMP220	Este trabalho
pLET	Contém a região N-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pDK6	ETTO, 2006
pLMA-MLV1	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pET28a	ARAÚJO, L. M. et al., 2000
pLMA-4	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> clonado	ARAÚJO, L. M. et al., 2000

	no vetor pT7-7	
pLMA-6	Contém o gene <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pDK6	ARAÚJO et al., 2004
pLMA-8	Contém o gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pDK6	ARAÚJO et al., 2004
pLMA-10	Contém a região N-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pET28a (<i>NdeI/BamHI</i>).	Este trabalho
pLMA-13	Contém a região central e C-terminal do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pET28a (<i>NdeI/BamHI</i>).	Este trabalho
pLMA-14	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pET28a (<i>HindIII/SacI</i>).	Este trabalho
pML-2A	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pTZ19R	ISHIDA, 1996
pMP220	Vetor para fusão transcricional <i>lacZ</i> . Tc ^R	SPAINK et al., 1987
pMSA-L1	Contém o gene <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no vetor pT7-7	ARAÚJO, M.S. et al., 2000
pTZ18R	vetor de expressão/ promotor <i>lac</i> . Amp ^R	MEAD et al., 1986
pTZ19R	vetor de expressão/ promotor <i>lac</i> . Amp ^R	MEAD et al., 1986
pT7-7	vetor de expressão/ promotor T7. Amp ^R	Biolabs

4.2 REAGENTES

Lisozima, o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo (ONPG), Tris base, glicerol, SDS, acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio, TEMED, e os antibióticos foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Alguns géis de poli-acrilamida foram preparados usando uma solução de acrilamida 30% (relação acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1) da Biotec. Fenol, ágar e agarose foram adquiridos da Invitrogen (Life-Technologies). EDTA, NaCl, NaOH, etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, clorofórmio e álcool isoamílico foram adquiridos da Merck ou Reagen. As enzimas modificadoras de DNA e RNase foram adquiridas da GE Healthcare, Gibco-BRL (Life-Technologies) ou New England Biolabs. Extrato de levedura, triptona e ágar bacteriológico foram adquiridos da Merck e Biobrás. Os demais reagentes utilizados foram provenientes de diversas fontes, todos eram reagentes analíticos.

4.3 MEIOS DE CULTURA

4.3.1 Meios empregados para o cultivo de *A. brasilense*

O meio NFbHP foi utilizado para cultivo de *A. brasilense* (PEDROSA e YATES, 1984; MACHADO et al., 1991) e apresentou a seguinte composição:

	gramas/litro
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-1}$
Ácido Nitrilo triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Lactato de sódio	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 20 mmol/L. A mistura de fosfato e a solução de cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio frio no momento do uso. Quando completo o meio de cultura apresentou pH 6,8 e foi denominado NFbHPN. O meio NFbHP sólido foi obtido adicionando-se ágar bacteriológico ao meio líquido na concentração de 15 g/L.

4.3.2 Meios empregados para o cultivo de *E. coli*

Os meios de cultura utilizados no cultivo das estirpes de *E. coli* foram: Luria-Broth (LB), SOB, SOC e Terrific-Broth.

O meio LB (SAMBROOK et al., 1989) apresentou a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O meio sólido LA foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido LB.

O meio Terrific-Broth (SAMBROOK et al., 1989) apresentou a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	24,0
Triptona	12,0
Glicerol	4,0
KH_2PO_4	2,31
K_2HPO_4	12,54

Para preparo de células eletrocompetentes as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB (SAMBROOK et al., 1989). Este meio apresentou a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Triptona	20,0

NaCl	0,6
KCl	0,186

O pH foi ajustado para 7 com NaOH 2 mol/L. O meio SOC foi obtido com a adição de glucose 3,6 g/L, MgCl₂ 0,94 g/L e MgSO₄ 1,2 g/L ao meio SOB.

4.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados, as concentrações das soluções estoque e suas concentrações de uso estão na tabela 3.

TABELA 03 - CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS

Antibióticos	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	200	200
Ácido Nalidíxico (Nal)	10	10
Canamicina (Km)	50	50
Cloranfenicol (Cm)	30	30
Streptomicina (Sm)	100	100
Tetraciclina (Tc)	10	30

As soluções estoques dos antibióticos ampicilina, ácido nalidíxico, canamicina e Streptomicina foram preparadas em água destilada autoclavada, esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,22 µm) e mantidas a -20°C.

As soluções estoque de tetraciclina e cloranfenicol foram preparadas com etanol, sendo que a tetraciclina foi armazenada na ausência de luz a -20°C.

4.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido (LB), Terrific-Broth, SOB, ou SOC a temperatura de 37°C e agitação (130 rpm). Nos ensaios de β-galactosidase a estirpe de *E. coli* YMC10 foi cultivada em meio NFDM.

A estirpe FP2 de *A. brasilense* foi cultivada em meio líquido NFbHP a temperatura de 30°C.

Para cultivo de bactérias em meio líquido foi sempre mantida a relação de 1/5 de volume de meio para o volume total do frasco. Esta relação foi utilizada para manutenção da aeração durante o crescimento.

Para cultivo de *E. coli* em meio sólido foram utilizados os meios de cultivo LA a 37°C.

Para cultivo de *A. brasilense* em meio sólido foi utilizado o meio de cultivo NFbHP a 30°C.

4.6 ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS

Estoques das estirpes de *E. coli* e *A. brasilense* foram preparados centrifugando-se 1 mL da cultura saturada por 1 minuto a 12000g. O sedimento de células obtido foi ressuspensão em 1mL de glicerol 50% e conservado a -20°C. As células também foram mantidas em meio sólido a 4 °C.

4.7 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE *Azospirillum brasilense*

Cinquenta mililitros de uma cultura saturada de *A. brasilense* em NFbHPN foram centrifugados a 4.300 G, 4°C por 10 minutos. O sedimento de células foi lavado uma vez com 30 mL do tampão TES (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 20mM EDTA, 200 mmol/L NaCl) e ressuspensão em 20 mL de TES. À solução foi adicionado lisozima (100 µg/mL) e a suspensão incubada a 30°C por 30 minutos. Em seguida, SDS (dodecilsulfato de sódio) foi adicionado para concentração final 1% (m/v), e a mistura incubada à temperatura ambiente por mais 5 minutos.

Após lise celular, Pronase E (200 µg/mL) foi adicionada e o sistema homogeneizado por inversão seguida de incubação a 50°C por 3 horas.

Para a purificação do DNA foram feitas quatro extrações com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o DNA gênomico de *A. brasilense* foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 300 µL de TE (10 mM Tris.HCl pH 8,0, 1 mM EDTA).

4.8 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nifA* DE *A. brasilense*

A amplificação do DNA foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por KOCHER e WILSON (1991) utilizando oligonucleotídeos sintetizados quimicamente. Estes oligonucleotídeos alinham-se em diferentes regiões do gene *nifA* de *A. brasilense* e foram utilizados para permitir a amplificação de algumas de suas regiões separadamente.

Para a reação de amplificação foram utilizados: tampão de PCR (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50 mmol/L KCl), 0,2 mmol/L dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo (esses oligonucleotídeos foram desenhados por nós e elaborados afim de amplificar as diferentes regiões de *nifA* e o gene inteiro), 1,5 mmol/L MgCl₂, 0,75 µL de DMSO, aproximadamente 20 ng de DNA molde e 1 µL de *Taq* DNA polimerase (purificada em nosso laboratório) em um volume final de reação de 25 µL. Diferentes condições foram testadas no decorrer das amplificações, entre elas: (I) variação de MgCl₂ de 0,5-3 mmol/L; (II) variação de “primers” 5-50 pmol; (III) variação de DNTP de 0,1-0,5 mmol/L; (IV) presença ou ausência de DMSO; (V) diferentes DNA molde (pML2A ou DNA cromossomal de *A. brasilense*); (VI) diferentes DNA polimerases termo estáveis (*Taq* DNA polimerase - purificada em nosso laboratório, Platinum *Taq* DNA Polymerase – Invitrogen, HotMaster *Taq* DNA Polymerase - Eppendorf). Também foram testados vários parâmetros para os ciclos de amplificação, incluindo diferentes temperaturas de anelamento e tempo de extensão, diversos gradientes de temperatura e rampas. O melhor resultado de amplificação foi obtido com os “primers” NifA5’NT e NifA3’Cent usando DNA cromossomal de *A. brasilense* como molde, 0,75 µL de DMSO, 0,2 mmol/L dNTPs, 1,5 mmol/L MgCl₂, com a HotMaster *Taq* DNA Polymerase com o seguinte programa: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 3 minutos a 72°C *(com rampa de 20%); 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. Para as amplificações com os “primers” NifA5’NT e NifA3’CT, NifA5’Cent e NifA3’CT nenhuma das condições e programas testados foi satisfatória.

4.9 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

A extração de plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al.,1989). Uma cultura de células, incubada durante a noite em meio LB ou TB, foi centrifugada a 12000g por 30 segundos. O sedimento foi suspenso em tampão GET (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0) e a lise celular efetuada com a adição de 1% SDS e 0,2 M NaOH. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com 3M acetato de potássio pH 4,8. Após incubação por 10 minutos em banho de gelo foram adicionados 100µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a amostra foi agitada em agitador de tubos sendo então centrifugada. A fase aquosa foi coletada e adicionado 2 volumes de etanol 96% com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada a 12000g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em água. Alternativamente DNA plasmidial foi purificado usando-se o kit de purificação de plasmídeos da Novagem.

A qualidade do DNA foi verificada através de eletroforese em agarose 0,7 a 1%. A concentração do DNA foi determinada pela absorbância a 260 nm, sendo que uma unidade de absorbância a 260 nm compreende a 50 µg/mL de DNA dupla fita. A pureza do DNA foi determinada pela relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm.

4.10 SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de ágar ou agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989).

Os géis de agarose foram preparados em tampão TAE (40 mmol/L Tris-acetato, 1mmol/L EDTA pH 8,3). A concentração de agarose ou ágar variou de 0,7 a 1,5% (m/v), dependendo do tamanho do DNA a ser analisado.

O DNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL). O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-documentação (GDS 5000).

4.11 CLIVAGEM DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

A digestão do DNA foi feita segundo protocolo descrito por SAMBROOK et al. (1989) ou especificado pelo fabricante.

Uma a cinco unidades das diferentes enzimas de restrição foram utilizadas para digestão de 0,2 – 1 µg de DNA, em um volume de 100 µL durante a noite em tampão e temperatura adequados para cada enzima.

Após incubação o DNA foi extraído com 100 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e então precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco a vácuo. O precipitado foi dissolvido em 10 µL de água ultra purificada (milliQ) estéril.

4.12 PREPARO DOS VETORES

Os vetores pDK7, pET28a e pMP220 foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição adequadas *XbaI/HindIII*, *NdeI/HindIII* e *HindIII*, respectivamente, de acordo com as especificações do fabricante. Após a restrição, as enzimas foram desnaturadas por calor ou por extração com 100 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e então precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80% e seco a vácuo. O precipitado foi dissolvido em 10 µL de água ultra purificada (milliQ) estéril.

4.13 LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR

O vetor linearizado (Material e Métodos item 4.12) foi ligado ao inserto numa proporção de 1:5 (mol) em um sistema contendo tampão de ligação (50 mmol/L Tris.HCl pH 7,6, 10 mmol/L MgCl₂, 1mmol/L DTT, 0,5 mmol/L ATP, 5% de PEG 8000) e 0,8 U de T4 DNA ligase, incubado a 18°C durante a noite. Antes da adição do tampão e da enzima, a mistura vetor-inserto foi aquecida a 65° C por 5 minutos e resfriada em gelo (baseado em SAMBROOK et al., 1989).

O fragmento de DNA obtido na reação de PCR com os “primers” NifA5’NT e NifA3’Cent foi clonado TA no vetor pCR 2.1 linearizado utilizando o “TA Cloning Kit” (Invitrogen), conforme especificações do fabricante.

4.14 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

4.14.1 Preparo de células eletrocompetentes para eletroporação

Para o preparo de células eletrocompetentes, duzentos e cinqüenta mililitros de meio líquido LB foram inoculados com 2,5 mL de uma cultura de *E. coli* cultivada durante 12 horas. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,5 e 1,0. A cultura foi mantida em gelo durante 20 minutos e em seguida transferida para tubos estéreis e centrifugada a 2990g por 10 minutos. As células foram então lavadas seqüencialmente com 250 mL e 125 mL de água estéril gelada e posteriormente, com 5 mL de glicerol 10% (v/v). Após centrifugação o sedimento de células foi ressuspense em 0,5 mL de glicerol 10% e a suspensão aliqüotada em tubos tipo Eppendorf (40 µL) e armazenada a -70°C por até 6 meses.

4.14.2 Transformação bacteriana

Para transformação bacteriana 50 ng do plasmídeo purificado ou da mistura da ligação vetor/DNA inserto foi adicionado a 40 µL da suspensão de células eletrocompetentes e a mistura foi incubada em gelo por 1 minuto. Essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BRL) e submetidas a um campo elétrico (4KΩ, 330µF) a fim de permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1mL de meio SOC e incubadas a 37°C, sob agitação por 40 minutos. Ao término da incubação, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo antibiótico adequado.

4.15 EXTRAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

Para análise dos plasmídeos recombinantes, foi utilizada a metodologia descrita por MONTEIRO et al. (2001). Duzentos microlitros de células cultivadas por 16 horas em meio TB foram transferidos para tubos tipo eppendorf e centrifugados por 30 segundos. Após a retirada do meio de cultura as células foram ressuspensas em 30 μ L de solução RL (10% glicerol, 5 μ g/mL RNase, 0,05% azul de bromofenol) e lisadas com a adição de 10 μ L de SDS 10%. Para precipitação de proteínas foi adicionado 3 μ L de KCl 3 mol/L seguido de incubação em gelo por 10 minutos. O sobrenadante foi então submetido à eletroforese em gel de ágar 1,5% em tampão TAE 1x (Material e Métodos item 4.10). Através deste procedimento, utilizando o plasmídeo sem inserto como padrão, foi possível visualizar a presença ou não de inserto nos plasmídeos analisados.

Os plasmídeos contendo inserto foram isolados (item 4.9), digeridos com as enzimas de restrição e posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose (item 4.10).

4.16 SEQUENCIAMENTO DO DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando didesoxirribonucleotídeos (SANGER et al., 1977) e um seqüenciador Automático de DNA (Applied Biosystems modelo 377). Neste sistema quatro cromóforos fluorescentes são utilizados como terminadores de cadeia, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida e detecção a Laser. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o sistema ET terminator (GE Healthcare), os parâmetros de amplificação foram definidos de acordo com os iniciadores utilizados. Como DNA molde para as reações de sequenciamento foram utilizados plasmídeos purificados ou produtos de PCR.

Os plasmídeos molde para sequenciamento foram purificados como descrito no item 4.9. Após a ressuspensão em água, o DNA foi tratado por 2 horas com RNase 10 μ g/mL a 37°C. Foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) a amostra foi agitada e então centrifugada, a fase aquosa foi

separada e adicionado 1 volume de clorofórmio. Após nova centrifugação, foram adicionados 2 volumes de etanol 96% a fase aquosa com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada a 12000g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspensão em água. O DNA purificado foi analisado em eletroforese de ágar, uma quantificação visual foi realizada utilizando um plasmídeo de concentração conhecida (pGEM – Promega). Cerca de 200 a 500 ng de DNA plasmidial foram utilizados nas reações de sequenciamento.

Os produtos de PCR para reação de sequenciamento foram misturados com acetato de amônio 7,5 mol/L e etanol 96% na seguinte proporção (40 µl da reação de PCR, 26 µl de acetato de amônio, 133 µl de etanol), a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, sendo centrifugada 12000g por 20 minutos. O DNA precipitado foi lavado 2X com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspensão em 40 µl de água. 3 µl do produto de PCR purificado foram utilizados como molde nas reações de sequenciamento.

4.17 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO

Os plasmídeos pLANTDK7MP ou pLANifADK7MP a serem transferidos para as estirpes de *A. brasilense* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (*tra*⁺). As estirpes de *A. brasilense* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas até saturação nos meios NFbHPN e LB, respectivamente. Cinco microlitros da cultura de *E. coli* foram utilizados para inocular 2 mL de meio LB sem antibióticos, 100 µL da cultura de *A. brasilense* foram utilizados para inocular 5 mL de meio NFbHPN sem antibióticos. As culturas foram mantidas a 37°C e 30°C, respectivamente, sob agitação constante (120 rpm) por 5 horas. Em seguida, 50 µL de *A. brasilense* foram misturados com 5 µL de *E. coli*, as células foram plaqueadas como uma gota em meio LA/NFbHPN (1:1) e incubadas a 30°C durante 20 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFbHPN, diluída e plaqueada em meio NFbHPN contendo NH₄Cl 20 mM e os antibióticos adequados.

4.18 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN e BURRIS, 1967). Células de *A. brasilense* foram ensaiadas para atividade de nitrogenase em meio NFbHP líquido ou semi-sólido.

A atividade de nitrogenase em meio semi-sólido foi realizada em frascos de 10 mL tipo ampicilina contendo 4 mL de meio acrescido de 0,5 mM de glutamato. Como inóculo, foram utilizados 10 a 40 µL de uma cultura saturada previamente cultivada em meio NFbHP contendo 20 mM de NH₄Cl como fonte de nitrogênio. Após 16 – 24 horas de crescimento a 30°C, os frascos foram vedados com rolhas de borracha (subba-seal) e então injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco), a cultura foi incubada nas mesmas condições por 1 hora. Após este período foi coletada uma amostra de 0,5 mL da fase gasosa para análise do etileno formado por cromatografia. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C. O gás de arraste foi o nitrogênio. Para o cálculo do etileno formado foi utilizado um padrão de etileno fornecido pela White Martins S.A. A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno total formado por minuto por miligrama de proteína total na cultura.

4.19 ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida como descrito por LAEMMLI (1970). A concentração do gel de corrida variou 7,5 a 15% de acordo com a massa molecular da proteína a ser analisada. As soluções estoque utilizadas estão descritas na tabela abaixo:

TABELA 04 – SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE SOB CONDIÇÕES DESNATURANTE

Acrilamida	30% Acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1)	Armazenada a 4°C
Solução 2	1,5M Tris-HCl pH8,8; 0,3% SDS	Armazenada a 4°C
Solução 3	0,5M Tris-HCl pH6,8; 0,4% SDS	Armazenada a 4°C
10% PA	Persulfato de amônio 10% v/v em água	Armazenada a 4°C
Tampão de amostra	2% SDS 10% glicerol; 0,01% azul de bromofenol; 0,0625M Tris-HCl pH 6,8; 5% β-mercaptoetanol (adicionado no momento do uso)	Armazenada a 4°C
Tampão de corrida (10X)	30g Tris-base, 140g Glicina 10g SDS por litro	Armazenado a temperatura ambiente

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (BioRad ou Höeffer). As corridas foram realizadas a 100-200V em tampão de corrida 1X durante 1 a 2 horas. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Blue ou com prata (BLUM et al., 1987). Para ensaios de immunoblot, as proteínas foram transferidas para membranas.

4.20 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NIFA E NIFA-HIS DE *A. brasilense* em *E. coli*

Cinco mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura de *E. coli* estirpe BL21 (λ DE3) *pLysS*, BL21(λ DE3) codonplus, Rosetta Blue (DE3) *pLysS*, C41 (λ DE3), C43 (λ DE3) ou BL21AI cultivada durante a noite e transformada com o plasmídeo *pLMA-10*, *pLMA-13*, *pLMA-14* ou *pET28a* (controle) ou *pDK7* (controle). Posteriormente, o plasmídeo *pLANTpET*, *pLANifApET*, *pLAeNifADK7* ou *pLAeNTDK7* também foi transformado na estirpe de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* ou BL21AI seguindo o mesmo procedimento. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante (200 rpm) até atingirem uma D.O₆₀₀ de aproximadamente 0,2, 0,4 ou 1,0. Neste ponto foi adicionado IPTG na concentração final de 0,1 ou 0,5 mmol/L ou lactose 0,5% (m/v). Quando a estirpe BL21 AI foi utilizada, a indução ocorreu com arabinose 0,2 ou 0,5% (m/v) além de IPTG. A seguir, as culturas foram incubadas sob agitação constante a 37°C ou 30 °C por um período de 0 a 4 horas ou a temperatura ambiente durante a noite. Como controle negativo, foi feita uma incubação por três horas sem a presença de qualquer agente

indutor. Após indução as células foram coletadas por centrifugação (12000g por 1 minuto a 4°C). Para análise das proteínas, o sedimento de células foi ressuspenso em 250 µL de tampão S (50 mmol/L Tris.HCl pH 7,5, 100 mmol/L KCl) e as células lisadas por sonicação por 2 minutos em ciclos de 20 segundos seguidos de 1 minuto de intervalo, no gelo, utilizando um sonicador (Heat System) equipado com uma microponeta. Após a lise, a mistura foi centrifugada a 12000g por 5 minutos a 4°C. As frações solúveis e insolúveis foram analisadas através de separação eletroforética em géis de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) segundo LAEMMLI (1970), assim como a proteína total. Também foram realizados ensaios de solubilização da proteína NifA adicionando-se diferentes concentrações de sal (NaCl ou KCl 0-500 mmol/L), glicerol (0-50%) e agentes solubilizadores (TWEEN 20, NP-40, Triton-X, hidrocloreto de guanidina, sarcosina e deoxilato de Sódio - NaDOC) ao tampão de sonicação.

4.21 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NIFA-HIS E NIFANT-HIS DE *A. brasilense*

Os plasmídeos pLANifApET e pLANTpET contendo o gene *nifA* de *A. brasilense* ou a sua região N-terminal, respectivamente, clonados no vetor pET28a foram utilizados para superexpressar as proteínas de fusão NifA-His ou NifANT-His com uma seqüência de aminoácidos contendo 6 resíduos de histidinas (seqüência HisTag).

Para purificação dessas proteínas, 250 mL de uma cultura de *E. coli* BL21 (λDE3) pLysS transformada com os plasmídeos pLANifApET ou pLANTpET foram induzidos como descrito em Material e Métodos item 4.20 com IPTG 0,5 mmol/L a 30°C por 3 horas. Após indução as células foram coletadas por centrifugação 18800g por 10 minutos a 4°C e ressuspenso em tampão de sonicação TS1+G (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT, 4 mol/L hidrocloreto de guanidina) contendo 10% de glicerol. Seis mililitros do sobrenadante livre de células em tampão TS1+G foram aplicados em uma coluna (1 mL) HiTrap-Chelating-Ni⁺². Em seguida, foram feitas lavagens sucessivas com 30 volumes de tampão de lavagem TP1+G (50 mmol/L TrisCl pH 6,3, 500 mmol/L NaCl) contendo 10 mmol/L e posteriormente 40 mmol/L imidazol, com concentrações decrescentes de hidrocloreto de guanidina de 4 a 0,1 mol/L. A eluição das proteínas de fusão foi feita

em tampão TP2 pH 8,0 (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT) contendo 50, 100, 300, 500 ou 1000 mmol/L de imidazol e 10% de glicerol. A purificação foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970) e as frações contendo as proteínas NifA-His e NifANT-His eluídas a partir de 500 mmol/L de imidazol foram dialisadas contra o tampão D (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 200 mmol/L NaCl, 0,1 mmol/L DTT, 50% glicerol) e em seguida armazenadas em alíquotas de 200 µL em nitrogênio líquido.

Todas as etapas da purificação foram realizadas a 4°C.

4.22 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GLNB-HIS E GLND-HIS DE *A. brasilense*

As proteínas GlnB-His e GlnD-His ligadas a uma seqüência contendo histidinas foram purificadas por cromatografia de afinidade em uma coluna HiTrap-Chelating-Ni⁺².

Trezentos mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura de *E. coli* BL21 (λDE3) transformada com o plasmídeo pLMA-MLV1 ou RB9065 (λDE3) transformada com o plasmídeo pALIpGT, cultivadas durante a noite. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante até atingirem uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,4. A indução das proteínas GlnB-His e GlnD-His foi feita com 0,5 mmol/L de IPTG a 37°C por 4 horas. Após indução as células foram coletadas por centrifugação 18800g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas no tampão de sonicação TS1 (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT) contendo 10% de glicerol. A sonicação foi realizada como descrito em Material e Métodos item 4.21.

Três mililitros do sobrenadante livre de células em tampão TS1 foram aplicados em uma coluna (1 mL) HiTrap-Chelating-Ni⁺². A resina foi preparada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (GE Healthcare) e equilibrada com tampão de sonicação TS1 (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT) contendo 10% de glicerol. A coluna foi lavada com 15 volumes do tampão TP1 (50 mmol/L TrisCl pH 6,3, 500 mmol/L NaCl), contendo 10 mmol/L imidazol e posteriormente com 15 volumes de TP1 pH 6,3 contendo 40 mmol/L de imidazol. A eluição da proteína de fusão foi feita em tampão TP2 (50 mmol/L TrisCl

pH 8,0, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT) contendo 50, 100, 300 ou 500 mmol/L de imidazol e 10% de glicerol. A purificação de ambas proteínas foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970) e as frações contendo a proteína GlnB-His e GlnD-His foram armazenadas em alíquotas de 500 μ L em nitrogênio líquido.

Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4°C.

4.23 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GLNB E GLNZ NATIVAS

Quinhentos mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* cultivadas durante a noite e transformada com os plasmídeos pMSA-L1 ou pLMA-4. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante (200 rpm) até atingirem uma D.O.₆₀₀ aproximadamente igual 1,2. A indução das proteínas PII foi feita com 0,5% (m/v) de lactose a 37°C por 4 horas. Após indução as células foram coletadas por centrifugação a 18800g por 10 minutos a 4°C.

As células foram ressuspensas em 8 mL de tampão de sonicação (50 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 200 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA pH 8,0, 20% glicerol), lisadas por sonicação em ciclos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto por 6 vezes utilizando um sonicador (Heat System) equipado com uma microponeta. Após a lise o material foi centrifugado a 18800g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi diluído quatro vezes com tampão C (50 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 1 mmol/L EDTA) e aplicado em uma coluna HiTrap-Heparin (GE Healthcare) de 5 mL, previamente equilibrada com três volumes de tampão A (50 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA). As proteínas PII foram eluídas com um gradiente de KCl de 0,1 a 1 mol/L em tampão A. Alíquotas de 500 μ L foram coletadas e analisadas por eletroforese em SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970).

Todas as etapas da purificação foram realizadas a 4°C.

4.24 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Esse método é baseado na ligação do Coomassie Blue G-250 com proteína (BRADFORD, 1976). O sistema de reação continha 1 mL de solução de Bradford

(100 mg/L Coomassie Brilliant Blue G250, 95% etanol, 85% ácido fosfórico) e 100 µL de amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância determinada a 595 nm. A curva padrão foi feita utilizando albumina de soro bovino (BSA) como referência (padrão). A sensibilidade deste método é de 1 a 10 µg de proteína.

4.25 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES NÃO-DESNATURANTES

As condições de eletroforese não-desnaturantes foram baseadas nos ensaios descritos por FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC (1994). As amostras foram misturadas com uma solução de amostra contendo 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol e 0,005% azul de bromofenol e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições não-desnaturantes, usando sistema de tampões descontínuos de pH elevado de Davis e Ornstein como descrito por GOLDENBERG (1989). Nesse sistema, os géis foram preparados na ausência de SDS e β-mercaptoetanol, sendo Nonidet P-40 0,025% (concentração final) adicionado ao gel de corrida e empilhamento. As amostras não foram fervidas antes de serem aplicadas no gel e a eletroforese foi executada a 4 °C e 100V por três (proteínas PII nativas) ou quatro horas (Proteínas PII-His-Tagged).

4.26 REAÇÃO DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *A. brasilense in vitro*

As reações de uridililação foram feitas utilizando-se a proteína GlnD-His de *A. brasilense* purificada. O sistema de reação de uridililação (15 µL) continha tampão U (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂ e 0.1 mmol/L DTT), com 1 mmol/L UTP, 3 µmol/L das proteínas PII e as concentrações indicadas de α-cetoglutarato e ATP, glutamina e GlnD. As reações foram incubadas a 30°C por 0 a 60 minutos e interrompidas pela adição de 5 µL de tampão de amostra (0,5 mol/L TrisCl pH 6,8, 10% de glicerol, 0,05% (m/v) de Azul de bromofenol) e 0,5 µL de EDTA 0,5 mol/L pH 8,0. Após a reação de uridililação as amostras foram mantidas no gelo até serem submetidas à eletroforese sob condições não-desnaturante (nativa) em gel 10% conforme descritos por FORCHHAMMER e TANDEAU de

MARSAC (1994). As proteínas foram coradas com prata (BLUM et al., 1987) ou SYPRO Red seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen) e as imagens foram gravadas usando um aparelho de UVP Biochemi system (UVP). O programa Labworks (UVP) foi usado na realização das análises quantitativas.

4.27 REAÇÃO DE DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *A. brasilense in vitro*

Para a realização dos ensaios de desuridililação, inicialmente foram feitas reações de uridililações totais das proteínas GlnB e GlnZ nativas de *A. brasilense* nas seguintes condições: 3 $\mu\text{mol/L}$ das proteínas PII foram incubados a 30°C por 30 minutos na presença de tampão de uridililação (10 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 10 mmol/L KCl, 2,5 mmol/L MgCl_2 e 0.1 mmol/L DTT) e 1 mmol/L UTP, 10 mmol/L α -cetoglutarato, 0,1 mmol/L ATP e 0,1 $\mu\text{mol/L}$ GlnD. As amostras foram mantidas no gelo até serem aplicadas em uma coluna de gel filtração (G-25) pré-equilibrada em tampão de uridililação. A eluição foi conduzida manualmente usando quatro volumes do mesmo tampão de uridililação. As proteínas GlnB e GlnZ eluídas foram então usadas em reações de desuridililação nas seguintes condições: 3 $\mu\text{mol/L}$ das proteínas PII-UMP foram incubados a 30 °C por 30 minutos na presença de tampão de uridililação e 1 mmol/L UTP, 2 mmol/L α -cetoglutarato, 0,1 mmol/L ATP e 100 $\mu\text{mol/L}$ GlnD e as concentrações indicadas de glutamina. As reações foram paradas com 10 mmol/L EDTA e 5 μL de tampão de amostra (0,5 mol/L TrisCl pH 6,8, 10% de glicerol, 0,05% (m/v) de Azul de bromofenol). Até serem aplicadas em gel de poliacrilamida para eletroforese em condições não desnaturantes, as amostras foram mantidas no gelo. As proteínas foram coradas com prata ou SYPRO Red seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen) e as imagens foram gravadas usando um aparelho de UVP Biochemi system (UVP). O programa Labworks (UVP) foi usado na realização das análises quantitativas.

4.28 “IMMUNOBLOTTING”

O método utilizado foi descrito por BURNETTE (1981).

Amostras a serem analisadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante utilizando o método descrito por LAEMMLI (1970) (item 4.19). Após a corrida, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (16 mmol/L Tris, 30,7 mmol/L glicina, 0,1% SDS, 20% metanol) por 10 minutos. O aparato para transferência (BioRad) foi montado e o gel foi colocado em contato com uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi feita por uma hora a 150 mA.

Após transferência a membrana foi incubada por duas horas a temperatura ambiente em tampão TBS (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 150 mmol/L NaCl, 0,002% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado, a fim de bloquear a membrana. Transcorrido esse período, foi adicionado o anticorpo contra a porção N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* (Anti-NifANTHs) (MONTEIRO et al., 1999a) em uma diluição de 1/500 ou 1/1000, e o sistema foi incubado por duas horas na mesma temperatura, sob leve agitação. Após esse período, a membrana foi lavada 3x em tampão TBS num período de 10 minutos. Após lavagem foi adicionado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (HRP) (GE Healthcare) diluído 1/10000 em TBS-5% leite, seguido de incubação durante duas horas sob agitação leve. Após esse período a membrana foi lavada três vezes, durante cinco minutos cada, com TBS. Terminadas as lavagens, sucedeu-se a revelação por quimioluminescência, utilizando o Kit ECL Western blotting detection reagents (AmershamBiosciences) segundo procedimento recomendado pelo fabricante e filme de raio – X KODAK, X-OMAT.

4.29 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS GLNB, NIFA-HIS E NIFANT-HIS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

As bandas correspondentes ao tamanho das proteínas GlnB, NifA-His e NIFANT-His foram retiradas de um gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS (LAEMMLI 1970), após serem coradas com coomassie blue, com o auxílio de ponteiros plásticos e transferidas para tubos eppendorfs. Os fragmentos do gel

foram submetidos a um tratamento de descoloração e desidratação, as proteínas foram degradadas com tripsina e os peptídeos formados foram extraídos.

A descoloração dos fragmentos do gel foi feita com 50 µl de uma solução 75 mmol/L bicarbonato de amônio em etanol 40%. Os tubos eppendorfs foram agitados em vortex por 30 segundos e permaneceram em repouso por 10 minutos. A solução foi descartada e a operação foi repetida mais duas ou três vezes, até a completa descoloração do gel.

Em seguida, o fragmento de gel foi desidratado com três etapas de acréscimo de 50 µl de acetonitrila 100% por 10 minutos, e em seguida, foram secos a vácuo por 25 minutos a 30°C.

A reidratação do gel foi feita com 15 µL de solução de tripsina gelada (10 µg/mL em tampão 25 mmol/L de bicarbonato de amônio) por 30 minutos a 4°C. Em seguida os tubos foram incubados em estufa a 37°C por um período de 14 a 16 horas para a digestão protéica.

Os peptídeos resultantes foram extraídos pela adição de 30 µl de solução de extração (50% acetonitrilo - ACN, 5% ácido trifluoracético - TFA) por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo. Essa operação foi repetida por mais duas vezes. Em seguida adicionou-se 20 µl de ACN 100% e a solução sobrenadante foi agrupada com as demais. Os peptídeos extraídos foram secos a vácuo à temperatura de 30°C e em seguida ressuspensos com 10 µl de TFA 0,1%.

Quando necessário, os peptídeos de cada amostra foram purificados utilizando uma ponteira com uma coluna de fase reversa "PerfectPure C-18 Tip" da Eppendorf. Primeiramente, essa ponteira foi pré-umidificada duas vezes com 10 µl de 50% ACN, 0,1% TFA e equilibrada duas vezes com 10 µl de TFA 0,1%. Em seguida, a amostra foi aspirada e expelida por pelo menos cinco vezes. Lavou-se a ponteira por duas vezes com TFA 0,1% para retirar contaminantes da amostra. Os peptídeos foram eluidos da coluna em 2 µl de ACN 50%, TFA 0,1% saturada com matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxiamínico) da Bruker Daltonics, pela sucção da solução por pelo menos três vezes. A solução de peptídeos foi dispensada diretamente em uma placa adequada à espectrometria de massa (MTP 384 massive MS target T da Bruker) onde os peptídeos foram cristalizados com a matriz pela evaporação da solução.

4.30 ENSAIO DE INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE AS PROTEÍNAS DO TIPO PII E A PROTEÍNA NIFANT-HIS (“pull-down”)

Ensaio de retenção de proteínas em resinas de agarose magnéticas Ni-NTA (Promega) foram realizados, seguindo as instruções do fabricante, para analisar a possível interação *in vitro* entre as proteínas do tipo PII de *A. brasilense* e o domínio N-terminal da proteína NifA. Esses ensaios foram realizados de forma bastante semelhante à descrita por LITTLE et al (2002, 2003). Em cada reação foram utilizados 0,25 $\mu\text{mol/L}$ da proteína NIFANT-HIS e/ou 0,8 $\mu\text{mol/L}$ das proteínas GlnB ou GlnZ nativas de *A. brasilense*. Também foi utilizado soroalbumina bovina (BSA) como controle negativo em algumas reações. A influência da presença ou ausência de ATP (3,5 mmol/L) e/ou α -cetoglutarato (2 mmol/L) também foi analisada e esses compostos foram adicionados nos tampões de incubação/lavagem (T_{pl}/L) (10 mmol/L HEPES, 150 mmol NaCl, 25 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L imidazol, pH 8,0) e eluição (T_{pE}) (10 mmol/L HEPES, 150 mmol NaCl, 25 mmol/L MgCl₂, 1000 mmol/L imidazol, pH 8,0). Nesses experimentos, o domínio N-terminal-His da proteína NifA foi inicialmente pré-incubado a temperatura ambiente com leve agitação por 15-20 minutos em um volume total de 500 μL em tampão de incubação T_{pl} contendo 30 μL da resina Ni-NTA. Após uma lavagem em tampão T_{pl}/L a segunda proteína (GlnB, GlnZ ou BSA) foi adicionada em volume final de 500 μL nesse mesmo tampão e uma segunda incubação de 30 minutos nas mesmas condições foi realizada. A resina foi então lavada por três vezes em tampão T_{pl}/L, o tampão posteriormente removido, e a eluição foi realizada em tampão T_{pE} contendo imidazol. Em seguida, alíquotas das diferentes condições testadas foram analisadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e coradas com Coomassie Blue ou com prata (BLUM et al., 1987).

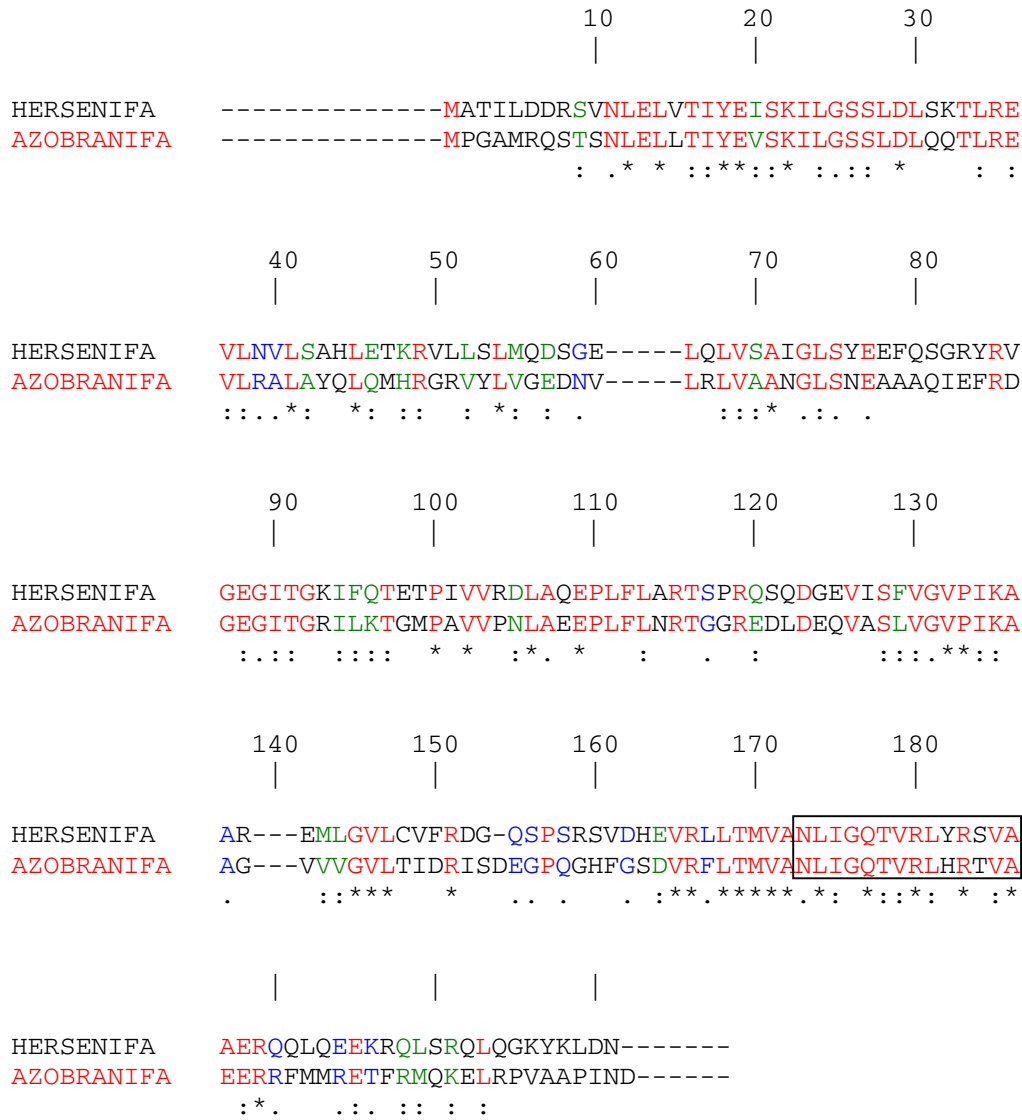
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS DOMÍNIOS SEPARADOS E DA PROTEÍNA NIFA INTEIRA DE *A. brasilense*

A proteína NifA, ativadora da transcrição dos genes *nif*, compreende 3 domínios característicos: o domínio C-terminal que possui um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado envolvido na ligação ao DNA; o domínio central que possui um motivo característico de ligação ao ATP, provavelmente envolvido na interação com a subunidade σ^N da RNA polimerase e com a formação do complexo aberto, sendo este o domínio catalítico da proteína NifA (LEE et al., 1993); por último, o domínio N-terminal que apresenta o menor grau de conservação da seqüência de aminoácidos entre as proteínas NifA e está envolvida na regulação da proteína por amônio (ARSENE et al., 1996; SOUZA et al., 1999). Esta proteína apresenta características comuns a muitos ativadores transcricionais que regulam a expressão de genes em conjunto com a RNA polimerase σ^N .

Em vista dos resultados relevantes obtidos com o estudo da proteína NifA de diferentes espécies de diazotrofos e da semelhança dessas proteínas nos organismos que não possuem a proteína reguladora NifL, as seqüências de aminoácidos do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *H. seropedicae* foram comparadas através do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1997). O alinhamento obtido é mostrado na figura 7 e a partir dele foram construídos oligonucleotídeos capazes de promover a amplificação da seqüência codificadora para a proteína NifA e de seu domínio N-terminal (Tabela 5).

FIGURA 7 – COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO N-TERMINAL DAS PROTEÍNAS NIFA DE *H. seropedicae* E *A. brasilense*.



Comparação da seqüência de aminoácidos do domínio N-Terminal das proteínas NifA de *A. brasilense* (AZOBRANIFA) e *H. seropedicae* (HERSENIFA) através do programa Clustal W. Em vermelho estão os aminoácidos idênticos, verde os aminoácidos de alta similaridade, azul os aminoácidos de baixa similaridade e no retângulo preto as regiões que correspondem ao final do domínio N-terminal das duas proteínas.

TABELA 05 – SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nifA* DE *A. brasilense*

Nome do “primer”		Seqüência
A	“Primer” NifA5’NT	<p style="text-align: center;">NdeI</p> <p style="text-align: center;">5’ GGTGTCG CATATG CCGGGTG 3’</p>
B	“Primer” NifA3’Cent	<p style="text-align: center;">5’ CATG AAGCTT TACTCCTCGGCC 3’</p> <p style="text-align: center;">HindIII</p>
C	“Primer” NifA3’CT	<p style="text-align: center;">5’ TACTGAT AAGCTT GCGGTTGTCC 3’</p> <p style="text-align: center;">HindIII</p>

“Primers” construídos para as regiões 5’ e 3’ do gene *nifA* de *A. brasilense*, com seus respectivos sítios de restrição. Os “primers” NifA5’NT e NifA3’Cent foram usados na amplificação da região N-terminal do gene e os “primers” NifA5’NT e NifA3’CT foram usados na tentativa de amplificar o gene *nifA* inteiro.

5.1.1 Construção de plasmídeos contendo a região que codifica para o domínio N-Terminal da proteína NifA

Com a finalidade de estudar a interação da proteína GlnB de *A. brasilense* com a região N-terminal de NifA desse mesmo organismo, bem como de obter um controle quando a proteína NifA inteira estivesse sendo estudada, foi necessária a clonagem da seqüência codificadora para o domínio N-terminal de NifA em um vetor de expressão.

A seqüência de nucleotídeos correspondente ao domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* foi amplificada com os “primers” NifA5’NT e NifA3’Cent utilizando como molde o DNA cromossomal de *A. brasilense*. Vários programas e condições foram testados (Material e Métodos item 4.8) até que se obtivesse um fragmento do tamanho esperado para a região N-terminal de *nifA*. Mesmo nesse caso, todas as amplificações sempre resultaram em várias bandas

além daquela do tamanho esperado (Figura 8). O fragmento obtido que apresentou aproximadamente 600 pares de bases, tamanho que corresponde à região N-terminal de NifA, foi clonado TA no vetor pCR2.1, juntamente com os demais fragmentos obtidos na reação de amplificação, conforme descrito em material e métodos (item 4.13). A análise dos produtos de ligação foi feita por restrição com a enzima *EcoRI*, que possui dois sítios de restrição localizados na região de policlonagem do vetor e um sítio na metade da região N-terminal de NifA (apêndice 3). Quatro plasmídeos com perfis de restrição diferentes do controle foram obtidos e podem ser visualizados na figura 9. Esses plasmídeos foram completamente seqüenciados e a seqüência obtida foi comparada com o banco de dados GENBANK. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se os “primers” Reverso ou Universal que anelam ao vetor pCR2.1 (Apêndice 3). Dois dos quatro insertos seqüenciados apresentaram 100% de identidade com o gene *nifA* de *A. brasilense*; confirmando que o produto clonado no vetor pCR2.1 corresponde à região N-terminal do gene *nifA* de *A. brasilense*. Um desses plasmídeos foi denominado pLANTTA e usados em uma restrição com as enzimas *XbaI* e *HindIII* a fim de se liberar o inserto correspondente a região N-Terminal de NifA. O fragmento liberado foi ligado no vetor pDK7 também cortado com as mesmas enzimas. A análise dos plasmídeos obtidos foi feita por digestão com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII* e revelou vários insertos correspondentes a região N-terminal do gene *nifA* (Figura 10) (no caso o gene clonado não é expresso). Um dos clones obtido nessa ligação foi denominado pLANTDK7 e posteriormente usado em uma restrição com as enzimas *NdeI* e *HindIII*, cujos sítios foram inseridos pelos “primers” NIFA5’NT e NIFA3’CENT, respectivamente, durante as reações de amplificação e permitiram a clonagem do gene na fase correta de leitura.

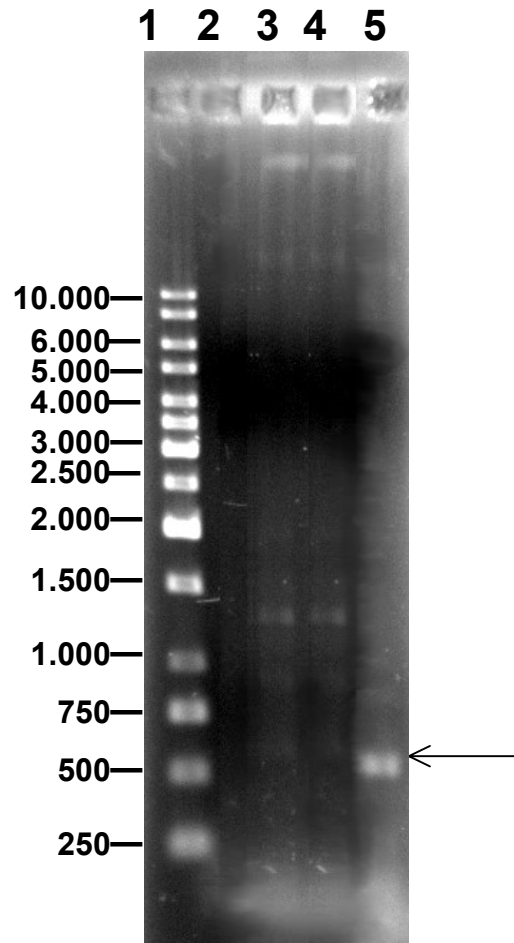
O vetor pET28a também foi clivado em paralelo com as enzimas *NdeI* e *HindIII*. Após a digestão, o vetor e o DNA inserto foram ligados conforme descrito em Material e Métodos (item 4.13). Doze colônias obtidas após a transformação tiveram seus plasmídeos analisados por restrição. Dois prováveis clones, cada qual contendo um inserto de aproximadamente 750 pb, referente ao domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* juntamente com parte do sítio de policlonagem do vetor, foram confirmados após a sua clivagem com as enzimas *XbaI* e *HindIII* e

denominados pLANTpET (Figura 11). Estes insertos também foram seqüenciados e confirmados como sendo a região N-terminal de *nifA*.

Uma vez confirmada a integridade de *nifA* no plasmídeo pLANTpET, este foi digerido com as enzimas *Xba*I e *Hind*III, liberando um fragmento contendo a região N-terminal de NifA que foi posteriormente ligada ao vetor pDK7 cortado com as mesmas enzimas (Figura 12). O plasmídeo resultante foi denominado pLAeNTDK7 e possui a região N-terminal de NifA na fase correta de leitura.

Por último o plasmídeo pLAeNTDK7 foi cortado com a enzima *Hind*III e co-integrado ao plasmídeo pMP220, cortado com a mesma enzima, originando o plasmídeo pLANTDK7MP (Figura 12).

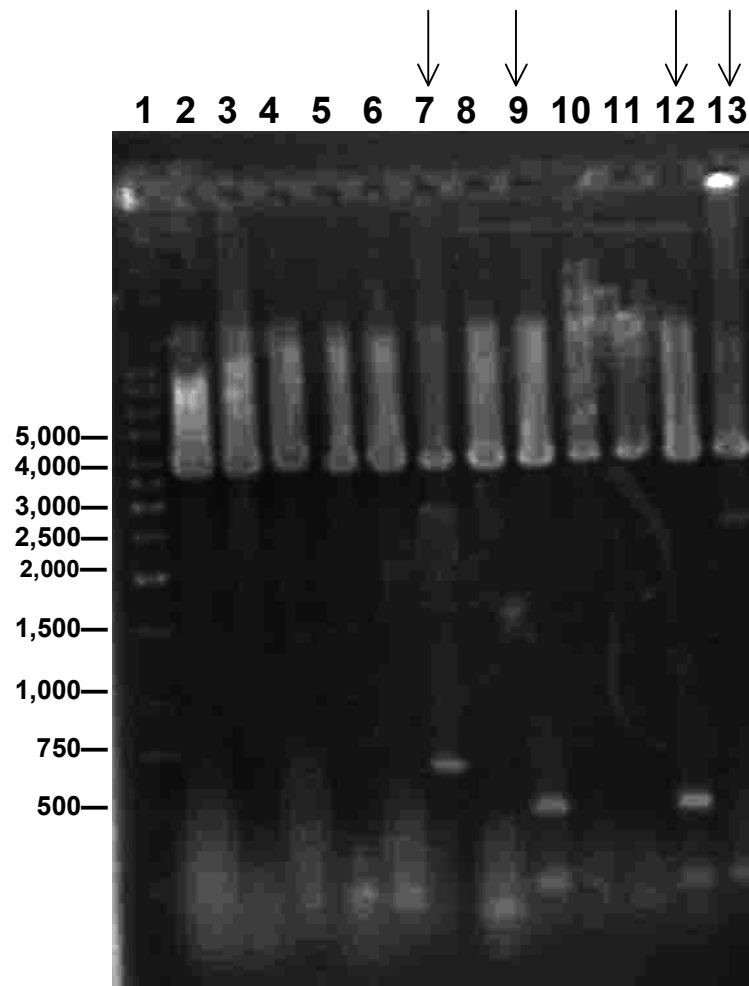
FIGURA 8 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR OBTIDO NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CORRESPONDENTE AO DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE *A. brasilense*



Linha 1 - Padrão de massa molecular 1 kb ladder; linha 2 – controle negativo da reação de PCR, sem o DNA molde; linha 3 – 5 produtos de PCR obtidos utilizando os “primers” NIFA5’NT e NIFA3’CENT e como molde o DNA cromossomal de *A. brasilense*. As reações foram feitas na presença de DMSO usando um gradiente de temperaturas de 41 a 63 °C, sendo apresentados os produtos obtidos nas temperaturas de 52,9, 53,8 e 55,0 °C, respectivamente.

Eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando tampão TAE 1X. O DNA foi corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. A seta indica o produto de PCR que corresponde ao tamanho da região N-terminal de *nifA*.

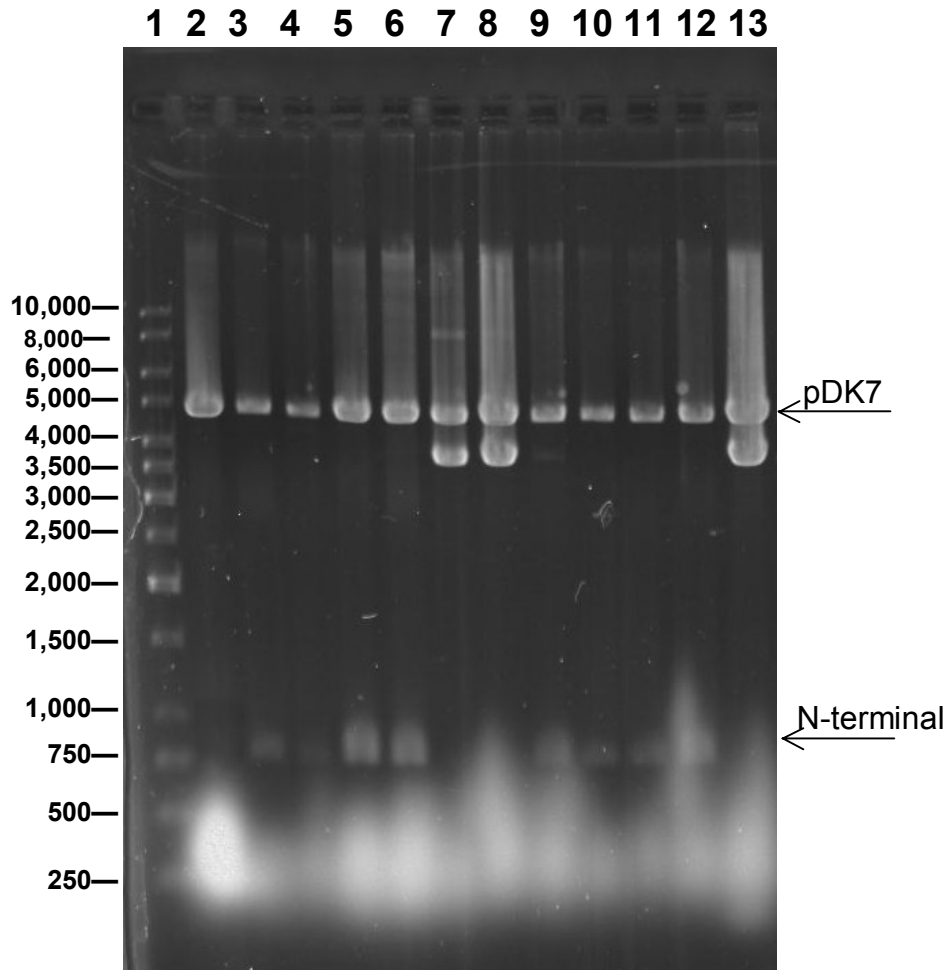
FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS PROVÁVEIS CLONES DA REGIÃO N-TERMINAL DO GENE *nifA* NO VETOR pCR2.1



Linha 1 – Marcador de massa molecular 1 kb Ladder; linha 2 – padrão eletroforético da reação de restrição do vetor pCR2.1 com a enzima *EcoRI*; linha 3 – 13 padrão eletroforético da reação de restrição com a enzima *EcoRI* dos plasmídeos obtidos com a ligação dos produtos de PCR ao vetor pCR2.1.

Eletroforese em gel de ágar 1,0% utilizando tampão TAE 1X. O DNA foi corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. As setas indicam os quatro plasmídeos que foram selecionados para posterior sequenciamento. Dois dos plasmídeos seqüenciados apresentaram 100% de identidade com o gene *nifA* de *A. brasilense* (linha 9 e 12) e um deles foi denominado pLANTTA.

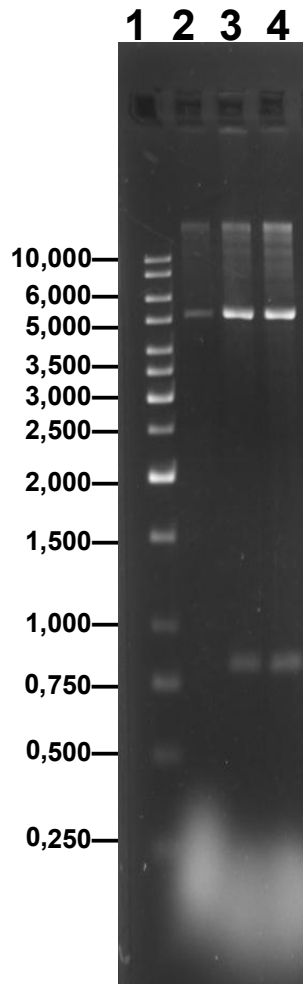
FIGURA 10 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS PROVÁVEIS CLONES DA REGIÃO N-TÉRMINAL DO GENE *nifA* NO VETOR pDK7



Linha 1 – Marcador de massa molecular 1 kb Ladder; linha 2 – padrão eletroforético da reação de restrição do vetor pDK7 com as enzimas *Xba*I e *Hind*III; linha 3 – 13 padrão eletroforético da reação de restrição com as enzimas *Xba*I e *Hind*III dos plasmídeos obtidos com a ligação do fragmento contendo a região N-terminal de *nifA* ligada no vetor pDK7.

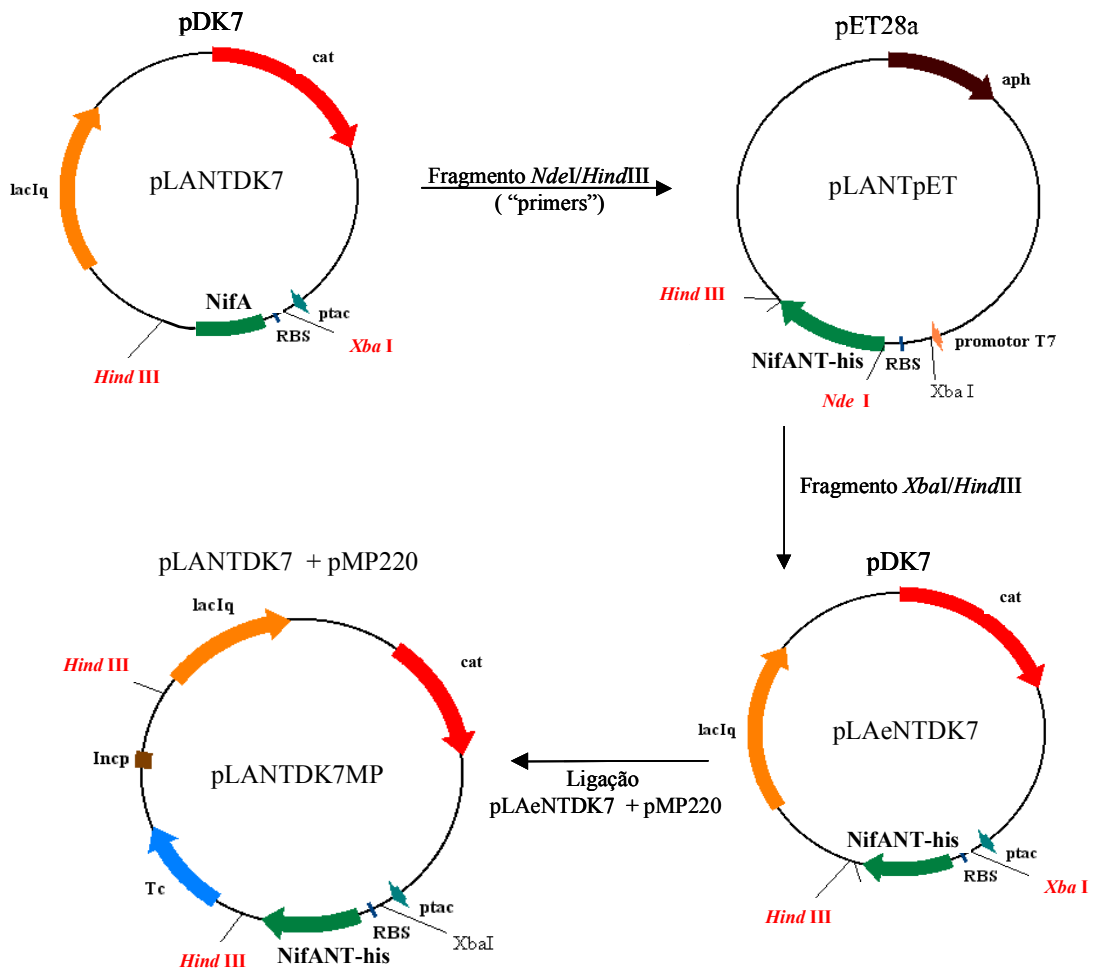
Eletroforese em gel de ágar 1,0% utilizando tampão TAE 1X. O DNA foi corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em pares de bases. Um dos plasmídeos obtido apresentando inserto correspondente ao tamanho da região N-terminal de *nifA* foram denominados pLANTDK7. As setas indicam os insertos correspondentes a região N-terminal do gene *nifA* ou o vetor pDK7.

FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO pLANTpET E DO CONTROLE pET28a DIGERIDOS COM AS ENZIMAS *Xba*I E *Hind*III



Linha 1 – Marcador de massa molecular 1 kb Ladder; linha 2 – padrão eletroforético da reação de restrição do vetor pET28a cortado com as enzimas *Xba*I e *Hind*III; linha 3 – 4 padrão eletroforético da reação de restrição do plasmídeo pLANTpET com as enzimas *Xba*I e *Hind*III. Eletroforese em gel de ágar 1,0% utilizando tampão TAE 1X. O DNA foi corado com brometo de etídio. Os marcadores estão indicados em kilo pares de bases.

FIGURA 12 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pLANTDK7MP



O plasmídeo pLANTDK foi digerido com a enzima *NdeI/HindIII* e ligado ao vetor pET28a. Posteriormente, o plasmídeo originado foi digerido com *XbaI/HindIII* e religado, agora "in frame" no vetor pDK7. O plasmídeo resultante foi então linearizado com a enzima *HindIII* e ligado no vetor pMP220 também linearizado com a mesma enzima. A construção originada, plasmídeo pLAeNTDK7 mais o vetor pMP220, foi denominada pLANTDKMP e usada na construção de mutantes *nifA-NT* de *A. brasilense* (ver Material e Métodos item 4.17)

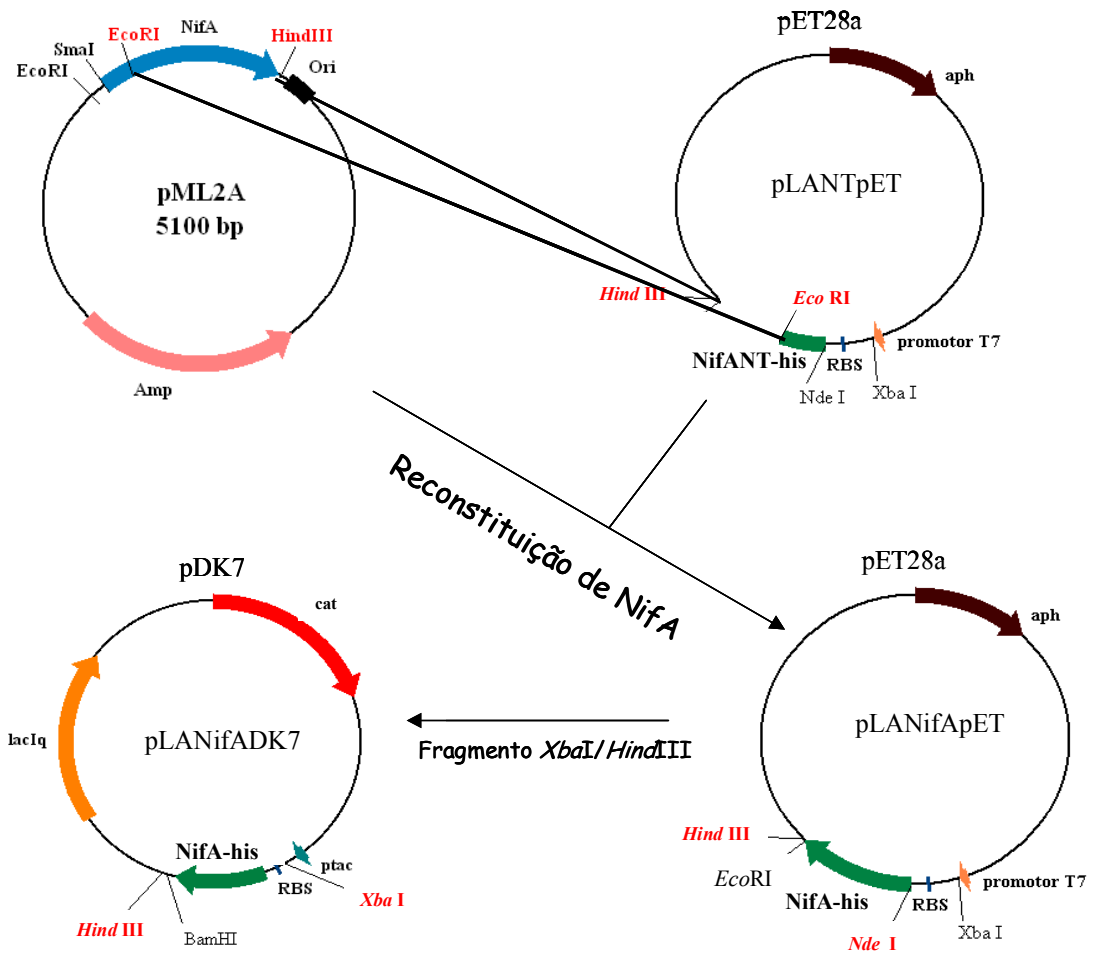
5.1.2 Construção de plasmídeos contendo o gene *nifA* de *A. brasilense*

Como não foi possível amplificar o gene *nifA* inteiro por PCR utilizando os oligonucleotídeos desenhados especificamente para ele (Tabela 5), uma nova estratégia para obtenção de *nifA* foi colocada em prática. Nessa estratégia, parte do gene *nifA* (final da porção N-terminal até a porção C-terminal) clonado no plasmídeo pML2A seria re-integrada a porção N-terminal de *nifA* já clonada no vetor pET28a (plasmídeo pLANTpET). Essa técnica foi adotada uma vez que já havia sido comprovada a integridade e a alta expressão da porção N-terminal oriunda do plasmídeo pLANTpET. Dessa forma os plasmídeos pML2A e pLANTpET foram cortados com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* e o inserto de aproximadamente 2 kDa, produto da restrição do plasmídeo pML2A, foi ligado ao plasmídeo pLANTpET sem a porção final da região N-terminal de NifA (Figura 13). O produto dessa ligação foi denominado pLANifApET e deveria ter o gene *nifA* inteiro de *A. brasilense* completamente restaurado e sendo fortemente expresso. O plasmídeo obtido foi analisado por restrição e sequenciamento e a clonagem esperada foi confirmada.

Uma vez confirmada a integridade de *nifA* no plasmídeo pLANifApET, este foi cortado com as enzimas *XbaI* e *HindIII*, liberando o fragmento contendo o gene *nifA* inteiro que foi então ligada ao vetor pDK7 cortado com as mesmas enzimas (Figura 13). O plasmídeo originado foi denominado pLANifADK7 e possuía o gene *nifA* inteiro, na fase correta de leitura.

Por último o plasmídeo pLANifADK7 foi cortado com a enzima *HindIII* e co-integrado ao plasmídeo pMP220 cortado com a mesma enzima originando o plasmídeo pLANifADK7MP.

FIGURA 13 – ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pLANifApET



O plasmídeo pML2A, que contém o gene *nifA* completo de *A. brasilense* clonado no vetor pTZ18R e possui expressão fraca da proteína, foi digerido com as enzimas *EcoRI/HindIII*. O fragmento resultante foi ligado no plasmídeo pLANTpET, que contém a região N-terminal de *nifA* clonada no vetor pET28a sendo fortemente expressa, cortado com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, pLANifApET, teve o gene *nifA* reconstituído e a proteína NifA capaz de ser fortemente expressa. Esse plasmídeo foi posteriormente cortado com as enzimas *XbaI/HindIII* e ligado no vetor pDK7 originando o plasmídeo pLANifADK7. Este plasmídeo também é capaz de expressar NifA em grandes quantidades.

5.2 EXPRESSÃO E SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA NIFA DE *A. brasilense* E DO SEU DOMÍNIO N-TERMINAL

Os plasmídeos pLANifApET e pLANTpET contendo as seqüências que codificam para proteína NifA inteira de *A. brasilense* e para a sua porção N-terminal, respectivamente foram utilizados para superexpressar essas proteínas ligadas a um oligopeptídeo que inclui seis resíduos de histidina na sua porção N-terminal. Estas proteínas serão indicadas neste trabalho como NifA-His (Proteína NifA inteira ligada a uma cauda de histidina) e NifANT-His (domínio N-terminal da proteína NifA ligada a uma cauda de histidina). A utilização do vetor pET28a é de grande valia uma vez que a presença da cauda de histidina na proteína expressa permite a utilização de cromatografia de afinidade, numa coluna contendo metal de transição, facilitando o processo de purificação.

A expressão das proteínas NifANT-His e NifA-His a partir do vetor pET-28a ocorre via promotor do fago T7. Dessa forma, para que ocorra a expressão, é necessário que a bactéria hospedeira produza a RNA polimerase do fago T7. A linhagem de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* na presença de um indutor, como IPTG ou lactose, é capaz de expressar esta enzima.

Inicialmente, foram feitos ensaios preliminares de indução das proteínas NifANT-His e NifA-His para determinar se estas estavam sendo expressas e se encontravam na fração solúvel do extrato celular. A figura 14 mostra que a estirpe de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* contendo o plasmídeo pLANTpET foi capaz de superexpressar uma proteína de aproximadamente 27 kDa, que não está presente no extrato celular dos transformantes contendo somente o vetor pET-28a. Esta proteína superexpressa corresponde à proteína de fusão NifANT-His (27 kDa) e apresenta-se predominantemente na fração insolúvel do extrato de células. Já na figura 15 é possível observar a presença de uma banda intensa, com taxa de migração de aproximadamente 65 kDa, que está presente somente na fração insolúvel do extrato de células de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pLANifApET. Esta proteína superexpressa corresponde ao tamanho esperado da proteína NifA de *A. brasilense* ligada a cauda de histidina (NifA-His). Estes resultados mostram que os clones obtidos são capazes de superexpressar o domínio N-terminal e a proteína NifA ligada a uma seqüência contendo histidinas.

Posteriormente, vários ensaios foram realizados para determinar as condições ótimas de indução para a proteína NifANT-His a fim de se obter uma máxima solubilidade e quantidade de proteína. Entre os parâmetros analisados estão: indutor (IPTG ou lactose); concentração do indutor; tempo de indução e temperatura (30 ou 37°C). Os resultados destes ensaios podem ser vistos na figura 16 e indicam que praticamente não houve melhora na solubilidade da proteína nas condições analisadas. No entanto, a quantidade de proteína expressa na fração total e insolúvel variou bastante conforme as condições testadas. Quando as células foram expressas com IPTG, a partir de duas horas de indução, tanto a 30 quanto a 37°C, a quantidade da proteína NifANT-His expressa foi extremamente elevada e predominante na célula (Figura 16-A), sendo que esta elevou-se um pouco mais a partir de três horas de indução e praticamente não variou quando a indução passou de três para quatro horas (Figura 16-B). Já quando as células foram expressas utilizando lactose como agente indutor, a proteína NifANT-His só passou a ser expressa em grandes quantidades a partir três horas de indução a 37°C ou quatro horas de indução a 30°C, não havendo em nenhum dos casos melhora na sua solubilidade (Figura 16-B). Baseado nos resultados de melhora na solubilização do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* ao mudar o agente indutor de IPTG para lactose (MONTEIRO et al., 1999a) esperava-se um resultado semelhante com o domínio da proteína de *A. brasilense*, no entanto, isso não ocorreu.

Como a proteína NifANT-His não foi encontrada na fração solúvel em quantidades satisfatórias em nenhuma das condições testadas, novos testes de indução foram realizados utilizando agora diferentes estirpes de *E. coli* (Material e Métodos item 4.1 e 4.20), numa tentativa de se melhorar a solubilidade da proteína. Nos ensaios onde a proteína NifANT-His de *A. brasilense* foi expressa na estirpe de *E. coli* BL21AI houve uma melhora, porém ainda que pouco significativa, na quantidade de proteína NifANT-His solúvel (Figura 17).

Numa última tentativa de melhorar a solubilidade da proteína NifANT-His foram usados diferentes tipos e concentrações de sais, detergentes e glicerol (ver Material e Métodos item 4.20). Parte dos resultados obtidos nesses ensaios de solubilização foram um pouco mais satisfatórias, sendo a proteína NifANT-His encontrada parcialmente solúvel em algumas das condições testadas (Figura 18). O tipo e a concentração do sal, bem como a utilização e baixas concentrações de

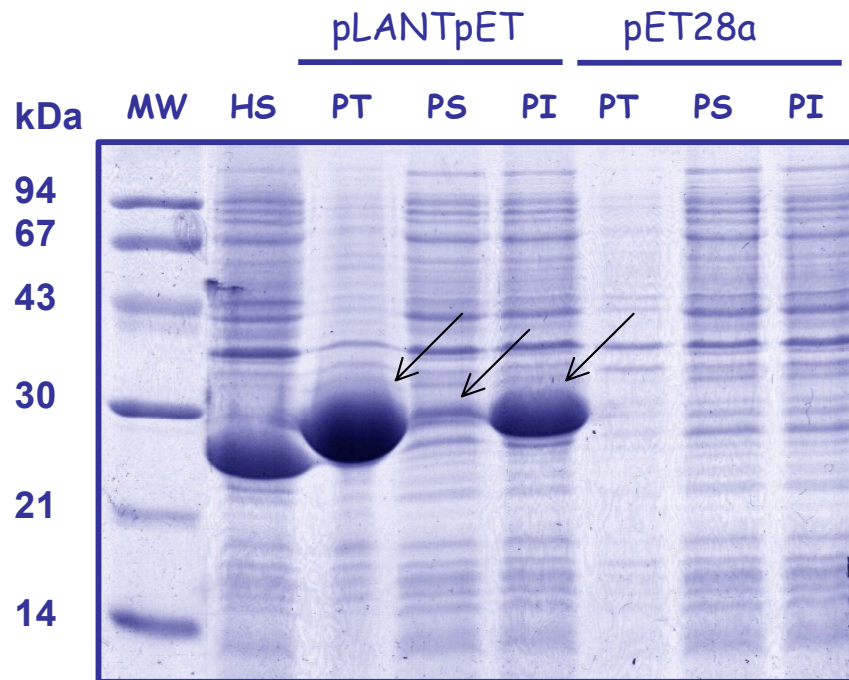
TRITON X-100 e sarcosina variaram pouco a solubilidade de NifA. Já o aumento na concentração de glicerol e o uso de hidrocloreto de guanidina (Figura 19) ou sarcosina elevaram a quantidade de proteína NifANT-His da fração solúvel (Figura 18).

Alguns dos parâmetros testados com a proteína NifANT-His também foram utilizados com as proteínas NifA-His e resultados muito semelhantes foram obtidos (dados não mostrados). A partir dos resultados obtidos foi possível adotar um protocolo de expressão para máxima otimização da solubilidade e da quantidade das proteínas NifANT-His e NifA-His. As condições utilizadas para expressá-las passaram a ser as seguintes: Indução da linhagem de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* transformada com o plasmídeo pLANTpET ou pLANifApET com IPTG 0,5 mmol/L por três a quatro horas a 30°C e solubilização da proteína com tampão de sonicação contendo hidrocloreto de guanidina 4 mol/L. Uma vez acertadas as condições de expressão da proteína NifANT-His os protocolos de purificação da mesma puderam ser iniciados (item 5.3).

Numa tentativa inicial para confirmar se a proteína expressa a partir do vetor pLANTpET era de fato a porção N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* foram feitos ensaios de imunodeteção (Material e Métodos item 4.28). Uma vez que anticorpos contra a proteína NifA de *A. brasilense* ainda não puderam ser produzidos, os ensaios de imunodeteção foram realizados com anticorpos contra a porção N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* (Anti-NifANTHs). Os anticorpos anti-NifA de *H. seropedicae* também reconhecem a proteína NifA de *A. brasilense* (ARAÚJO et al., 2004). O resultado obtido com esse experimento mostra que ocorreu o reconhecimento (dados não mostrados), indicando que o plasmídeo pLANTpET é capaz de expressar o domínio N-terminal da proteína NifA.

Posteriormente, a banda correspondente ao domínio N-terminal de NifA expresso a partir do vetor pLANTpET foi analisada por MALDI-TOF (item 4.29) (dados não mostrado), sendo confirmado de fato que se tratava da proteína em questão.

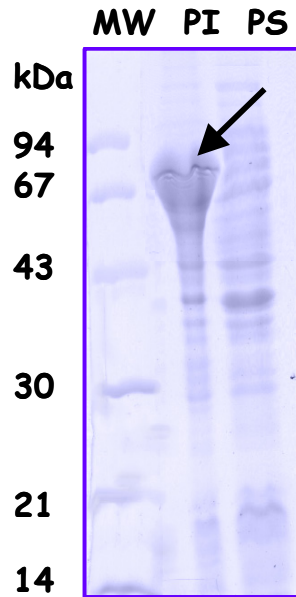
FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA NIFANT-HIS DE *A. brasilense* EXPRESSA EM *E. coli* A PARTIR DO PLASMÍDEO pLANTpET



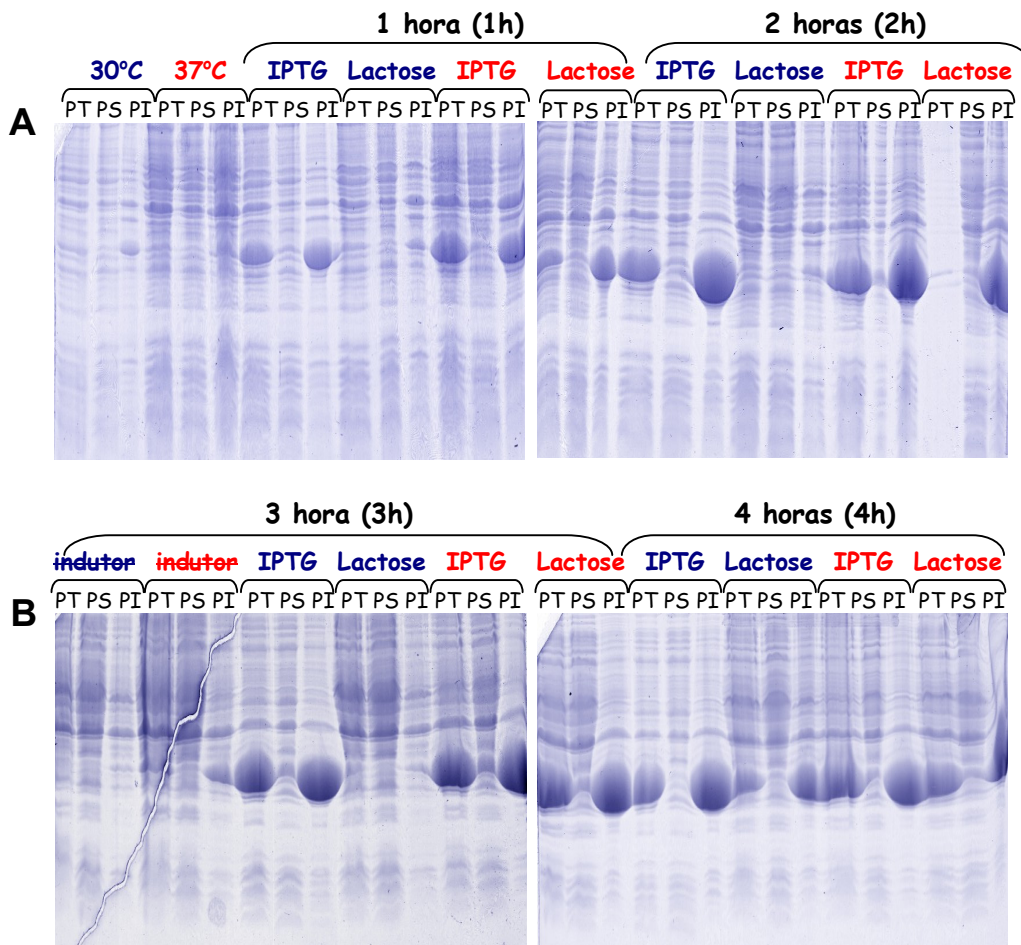
Gel de SDS-PAGE 15% com o perfil de indução do plasmídeo pLANTpET e do controle pET28a expressos em *E. coli*. MW – Marcadores de massa molecular em kDa; HS – extrato celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo pLET (expressa a região N-terminal da proteína NifA nativa de *H. seropedicae*) e induzidas por 3 horas com IPTG 0,5 mmol/L; pLANTpET – extrato celular total (PT), solúvel (PS) e insolúvel (PI) de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pLANTpET e induzidas por 3 horas com IPTG 0,5 mmol/L; pET28a – extrato celular total (PT), solúvel (PS) e insolúvel (PI) de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o vetor pET28a e induzidas por 3 horas com IPTG 0,5 mmol/L.

As setas indicam a região N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* superexpressa (NifANT-His). As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA NIFA-HIS DE *A. brasilense* EXPRESSA EM *E. coli* A PARTIR DO PLASMÍDEO pLANifApET



Eletroforese em gel 12,5% de poliacrilamida na presença de SDS. MW – Marcadores de massa molecular em kDa; PI – fração insolúvel do extrato de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo pLANifApET e induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L; PS – igual a linha 3 porém fração solúvel do extrato celular. A seta indica a proteína NifA de *A. brasilense* superexpressa (NifA-His). As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

FIGURA 16 – RESULTADO DAS CURVAS DE EXPRESSÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA de *A. brasilense* A PARTIR DO PLASMÍDEO pLANTpET

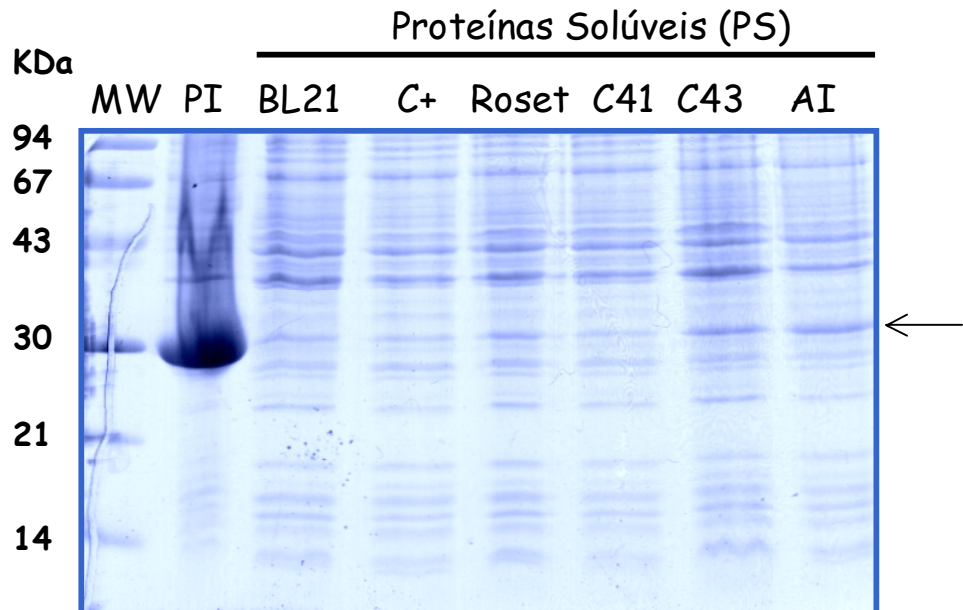
Painel A: 30°C - Extrato celular total (PT), fração solúvel (PS) e insolúvel insolúvel (PI), respectivamente, de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo pLANTpET, crescidas a 30°C e não induzidas; 37°C - igual a 30°C, porém as células foram incubadas a 37°C; (1h)/IPTG - igual a 30°C, porém as células foram induzidas por 1 hora com IPTG 0,5 mmol/L; (1h)/Lactose - igual a (1h)/IPTG, porém induzido com lactose 0,5%; (1h)/IPTG - igual a (1h)/IPTG, porém induzido a 37°C; (1h)/Lactose - igual (1h)/Lactose, porém induzido a 37°C; (2h)/IPTG - igual a (1h)/IPTG, porém as células foram induzidas por 2 horas com IPTG 0,5 mmol/L; (2h)/Lactose - igual a (2h)/IPTG, porém induzido com lactose 0,5%; 2h/IPTG - igual a 2h/IPTG, porém induzido a 37°C; 2h/Lactose - igual a 2h/Lac, porém induzido a 37°C.

Painel B: *indutor* - Extrato celular total (PT), solúvel (PS) e insolúvel (PI), respectivamente, de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo pLANTpET, crescidas por 3 horas a 30°C sem indutor; *indutor* - igual a *indutor*, porém a 37°C; 3h/IPTG - igual *indutor*, porém as células foram induzidas por 3 horas com IPTG 0,5 mmol/L a 30°C; 3h/Lactose - igual a 3h/IPTG, porém induzido com lactose 0,5%; 3h/IPTG - igual a 3h/IPTG, porém induzido a 37°C; 3h/Lactose - igual a 3h/Lactose, porém induzido a 37°C;

4h/IPTG - igual 3h/IPTG, porém as células foram induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L a 30°C; 4h/Lactose - igual a 4h/IPTG, porém induzido com lactose 0,5%; 4h/IPTG - igual a 4h/IPTG, porém induzido a 37°C; 4h/Lactose - igual a 4h/Lactose, porém induzido a 37°C;

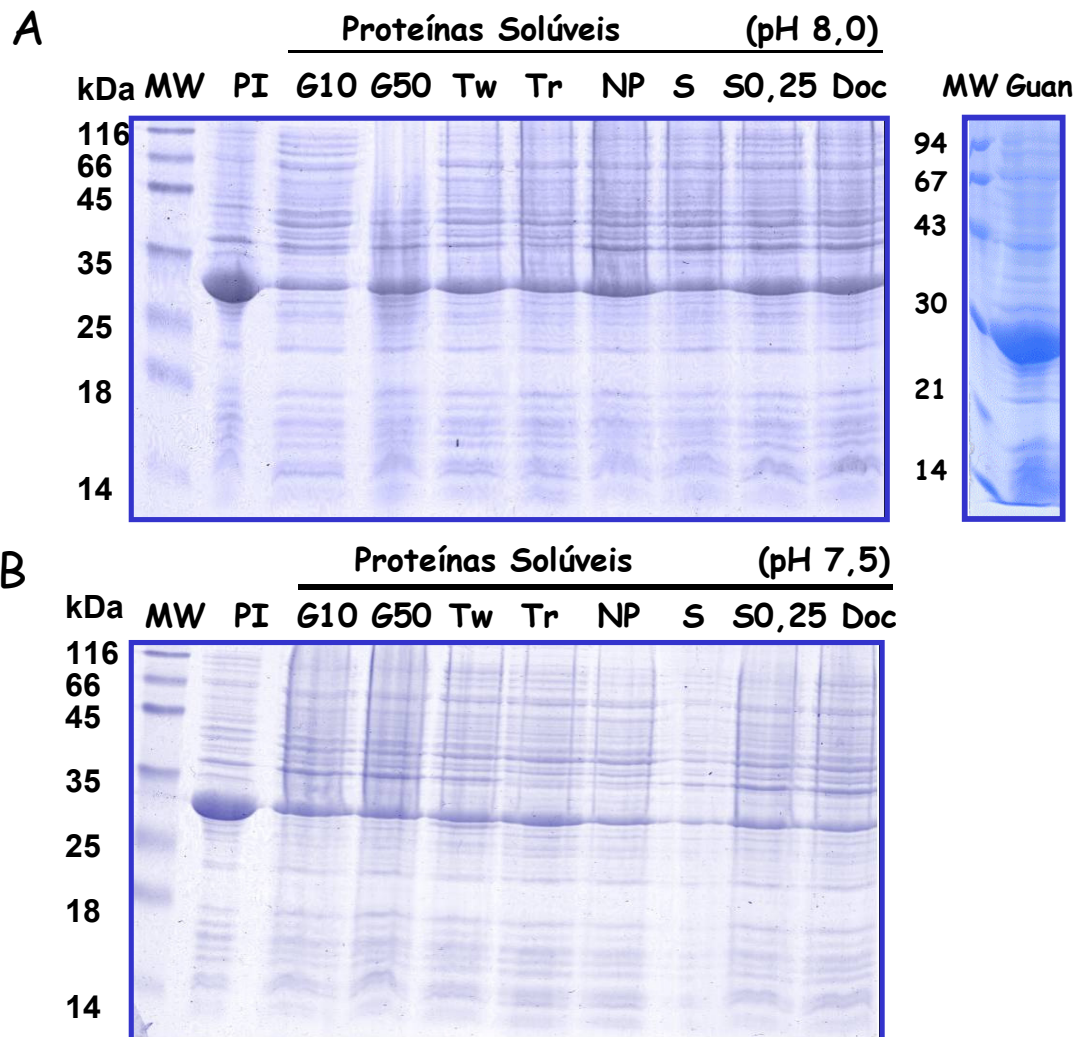
Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida na presença de SDS. As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

* A amostra dessa linha vazou do eppendorf durante o processo de fervura.

FIGURA 17 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA NIFANT-HIS EM DIFERENTES ESTIRPES DE *E. coli*

Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% com o perfil de indução do plasmídeo pLANTpET sendo expresso em diferentes linhagens de *E. coli*. MW - Padrão de massa molecular em kDa; PI – fração insolúvel do lisado de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo pLANTpET; BL21 - igual à linha PI porém a fração solúvel do lisado de bactérias; C+ - fração solúvel do lisado de bactérias BL21(λ DE3) codonplus transformadas com plasmídeo pLANTpET; Roset - igual à linha C+ porém de bactéria Rosetta Blue (DE3) *pLysS*. C41 - igual à linha C+ porém de bactéria C41 (λ DE3); C43 - igual à linha C+ porém de bactéria C43 (λ DE3); AI - igual à linha C+ porém de bactéria BL21AI. As células de *E. coli* foram induzidas com 0,5 mmol/L IPTG por três horas a 37 °C. A seta indica a região N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* expressa (NifANT-His). As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

FIGURA 18 – EFEITO DO PH E DE DIFERENTES REAGENTE NA SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA NIFANT-HIS



Painel A e B: Gel de SDS-PAGE 12,5% mostrando resultados obtidos com a curva de solubilização da proteína NIFANT-HIS com diferentes agentes solubilizantes em pH 8,0 e 7,5, respectivamente. MW - Padrão de massa molecular em kDa; PI – fração insolúvel do lisado de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo pLANTpET; G10 - fração solúvel do extrato celular transformado com plasmídeo pLANTpET com adição de 10% glicerol ao tampão de sonicação; G50 - igual à G10 porém na presença de 50% glicerol; Tw - igual à G10 porém na presença de 0,1% tween 20; Tr - igual à G10 porém na presença de 0,1% triton X100; NP - igual à G10 porém na presença de 0,1% Nonidet-P40; S - igual à G10 porém na presença de sarcosina 0,1%; S0,25 - igual à G10 porém na presença de sarcosina 0,25%; Doc - igual à G10 porém na presença de Desoxicolato de Sódio 0,2%; Guan - igual à G10 porém na presença de hidrócloro de guanidina 4 mol/L. As células de *E. coli* foram induzidas com 0,5 mmol/L IPTG por três horas a 37°C. Proteínas foram coradas com Coomassie blue.

5.3 PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL E DA PROTEÍNA NIFA DE *A. brasilense*

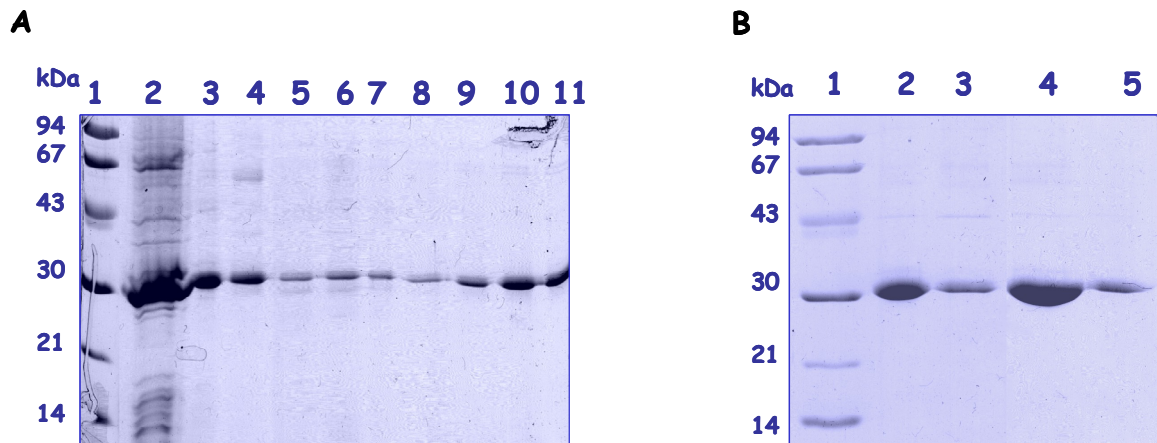
Encontradas as melhores condições de expressão e solubilização das proteínas NifANT-His e NifA-His de *A. brasilense*, foram iniciados os procedimentos para purificação das mesmas. Como as proteínas estavam fusionadas a uma cauda de histidina na sua região N-terminal, o procedimento de purificação adotado foi muito semelhante ao usado para purificar as proteínas GlnD-His e GlnB-His (Material e Métodos item 4.21 e 4.22).

Os plasmídeos pLANTpET e pLANifApET contendo a região N-terminal de *nifA* de *A. brasilense* e a proteína inteira clonadas no vetor pET28a foram utilizados para superexpressar as proteínas de fusão NifANT-His e NifA-His, respectivamente. Para purificação dessas proteínas, trezentos mililitros de uma cultura *E. coli* BL21 (λ DE3) foram transformados com o plasmídeo pLANTpET ou pLANifApET e induzidos com IPTG 0,5 mmol/L por 4 horas a 30 °C. Para solubilizar as proteínas foi necessário adicionar hidrocloreto de guanidina 4 mol/L no tampão de sonicação (TS1+G) e posteriormente fazer lavagens com concentrações decrescentes desse composto adicionado ao tampão de lavagem. O extrato celular, após solubilização e sonicação, foi aplicado em uma coluna de Hitrap-Chelating-Ni⁺² (GE Healthcare). Durante a lavagem da coluna com o tampão TP1, foi feito um gradiente decrescente de hidrocloreto de guanidina de 4-0,1 mol/L. Esse gradiente foi necessário para retirar lentamente a hidrocloreto de guanidina da proteína enquanto essas estavam adsorvidas na coluna (ver Material e Métodos item 4.21). As proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente de imidazol de 50 a 1000 mmol/L. Nessas condições, as duas proteínas, NIFANT-His e NifA-His foram eluídas a partir de 500 de imidazol (Figura 19, painel A e 20).

As melhores frações contendo a proteína NifANT-His foram agrupadas e dialisadas contra um tampão de diálise (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 0,1 mmol/L DTT, 50% glicerol) e analisadas em uma eletroforese desnaturante. A figura 19 (painel B) e a tabela 6 mostram o resultado da diálise da proteína NIFANT-His e a tabela de purificação da proteína. Para avaliar o grau pureza da proteína purificada, o gel foi submetido a uma análise densitométrica e a proteína apresentou 99% de pureza.

O mesmo procedimento de diálise realizado com a proteína NifANT-His foi realizado com a proteína NifA-His. No entanto, esta última precipitou, tanto nas mesmas condições usadas para as proteínas NifANT-His quanto em outras condições também testadas, o que dificultou a sua utilização nos experimentos (dados não mostrados).

FIGURA 19 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES DA PROTEÍNA NIFANT-HIS OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE



Painel A: Linha 1 - Padrão de massa molecular em kDa; linha 2 - fração solúvel do lisado de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pLANTpET solubilizadas em tampão TS1 (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT, 4 mol/L hidrocloreto de guanidina); linhas 3 a 11 - proteínas eluídas da coluna Hitrap-Chelating-Ni⁺² com 500 a 1000 mmol/L de imidazol. As frações purificadas eluídas a partir de 500 mmol/L de imidazol foram dialisadas e submetidas a uma nova eletroforese (Painel B).

Painel B: Linha 1 - Padrão de massa molecular em kDa; linhas 2 a 5 - frações dialisadas da proteína NifANT-His. Análise densitométrica dos géis de eletroforese revelou que a proteína NifANT-His alcançou até 99% de pureza.

Eletroforese em gel 12,5% de poliacrilamida na presença de SDS. As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

TABELA 06 – ESQUEMA DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NIFANT-HIS DE *A. brasilense*

NIFANT-His	
Volume de cultura	300 mL
massa úmida de Células (g)	≅ 3
Fração mais concentrada	4,55 µg/µL
Proteína total ^a (mg)	150
Proteína purificada (mg)	≅ 5 ^c
Pureza ^b (%)	99

As proteínas foram purificadas conforme descrito em Material e Métodos (itens 4.21).

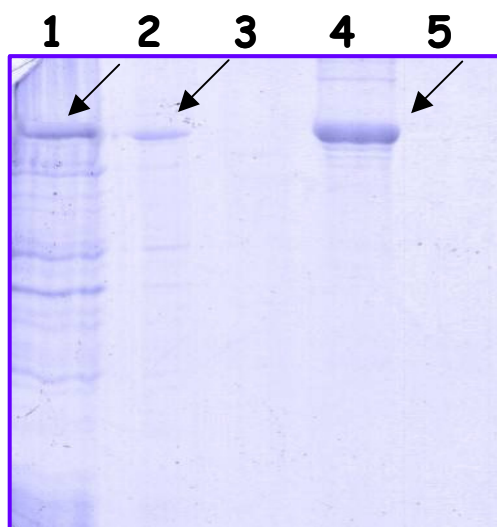
a A proteína total corresponde ao sobrenadante do lisado celular.

b A pureza da proteína foi determinada por densitometria a partir de géis de eletroforese corados com coomassie blue.

c Concentração da proteína NIFANT-His após cromatografia de afinidade na coluna Hitrap-Chelating-Ni²⁺ (GE healthcare).

Em trabalhos anteriores já foi descrito a purificação da região N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* (MONTEIRO et al., 1999a) e de *K. pneumoniae* (BERGER et al., 1995). Em ambos os casos as proteínas se apresentavam apenas parcialmente solúveis e também foram purificadas com auxílio de agentes solubilizadores como detergentes. Os dados apresentados na tabela 6 indicam que partindo de apenas 300 mL de cultura em um único passo cromatográfico a proteína NIFANT-His foi purificada atingindo 99% de homogeneidade. As melhores frações obtidas na purificação dessa proteína foram utilizadas em ensaios de “Pull-down” *in vitro* (Material e Métodos item 4.30).

FIGURA 20 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES DA PROTEÍNA NIFA-HIS PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE



Linha 1 – Fração solúvel do extrato de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo *pLANifApET*, induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L e solubilizadas em tampão TS1+G (50 mmol/L TrisCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 1mmol/L DTT, 4 mol/L hidrocloreto de guanidina); linhas 2 a 5 – parte do gradiente de eluição da proteína NifA-His obtido com a coluna de afinidade Hitrap-Chelating-Ni⁺² (GE healthcare). As setas indicam a proteína NifA de *A. brasilense*. Análise densitométrica do gel de eletroforese revelou que a proteína NifA-His alcançou até 96% de pureza. Eletroforese em gel 12,5% de poliacrilamida na presença de SDS.

As setas indicam a proteína NifA de *A. brasilense* superexpressa (NifA-His). As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

5.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII (GLNB E GLNZ) E GLND DE *A. brasilense*

5.4.1 Purificação das proteínas GlnB e GlnZ nativas por cromatografia afinidade

As proteínas do tipo PII (GlnB e GlnZ), juntamente com a proteína GlnD, possuem um papel central no sistema Ntr, sendo as primeiras, capazes de interagir e modificar a atividade de diferentes proteínas do metabolismo nitrogenado de acordo com o seu estado conformacional, livre ou uridilado, resultado da ação de GlnD.

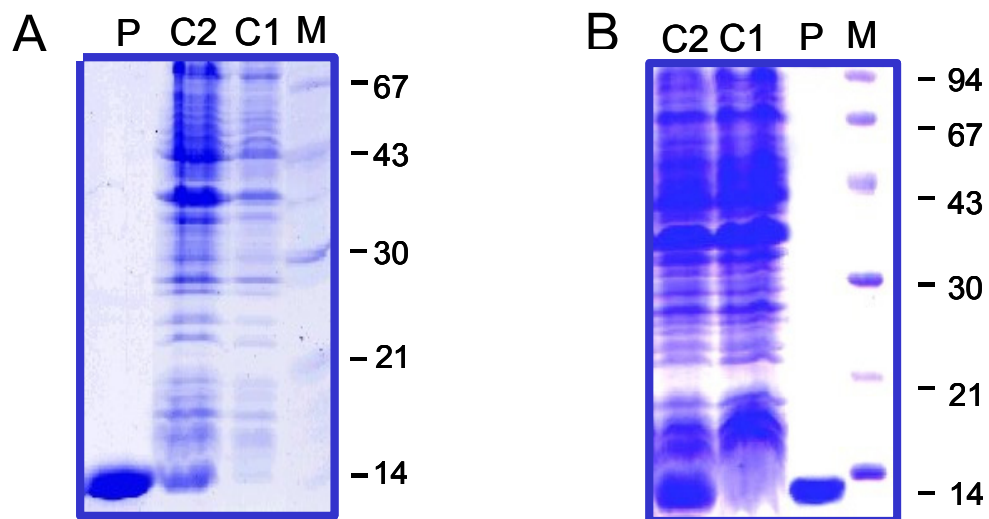
Os genes *glnB* e *glnZ* foram clonados a partir do genoma de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 utilizando amplificação de DNA por PCR (ARAÚJO, L. M. 2000, ARAUJO, M. S. 2000) e as proteínas GlnB e GlnZ puderam então ser superexpressas e purificadas. Para a expressão dessas proteínas foram utilizados os vetores pET-28a e pT7-7. Estes vetores possuem o promotor de fago T7 que é reconhecido pela RNA polimerase do fago T7 expressa nas estirpes de *E. coli* BL21 (λ DE3) *pLysS* ou RB9065 (λ DE3), assim, na presença do indutor a T7 RNA polimerase é sintetizada e transcreve com alta eficiência a partir do promotor T7. Desta forma, as proteínas PII de *A. brasilense* puderam ser superexpressas em grandes quantidades e purificadas nas formas nativas ou fusionadas a uma cauda de histidina (ARAÚJO, L. M. 2003, ARAUJO, M. S. 2003).

Neste trabalho utilizamos um procedimento de purificação diferente do descrito anteriormente (ARAÚJO, L. M. 2003, ARAUJO, M. S. 2003). Na metodologia anterior, após a lise celular, o extrato de células era tratado com sulfato de protamina e posteriormente cromatografado em dois tipos de resinas (ARAÚJO, L. M. 2003, ARAUJO, M. S. 2003). Ao analisar os resultados de purificação obtidos seguindo esse protocolo foi possível visualizar uma grande perda tanto de GlnB quanto de GlnZ nos dois passos iniciais de purificação. Numa tentativa de reduzir a perda de parte dessas proteínas, novos experimentos de purificação foram realizados, agora utilizando um único passo cromatográfico com a coluna de afinidade HiTrap Heparin (GE Healthcare) (Material e Métodos item 4.23).

Para realizar a purificação dessas proteínas, uma cultura de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS transformada com o plasmídeo pLMA-4 (expressa GlnB) ou pMSA-L1 (expressa GlnZ) foi induzida por 3-4 horas com 0,5 mmol/L de IPTG. Após coleta e lise das células o sobrenadante obtido foi cromatografado em uma coluna HiTrap Heparin (GE Healthcare). As proteínas PII foram adsorvidas na coluna de heparina e eluídas utilizando um gradiente de KCl de 0,1 a 1,0 mol/L. Nessas condições, as proteínas GlnB e GlnZ foram eluídas com aproximadamente 400 mmol/L de KCl. Com este procedimento purificou-se eficientemente as proteínas GlnB e GlnZ alcançando uma pureza de até 92% para GlnZ e 95% para GlnB (Figura 21). As frações contendo as proteínas PII com uma pureza mais elevada foram utilizadas em experimentos de interação e uridililação *in vitro*.

Ao retirar os dois passos iniciais de purificação (tratamento com sulfato de protamina e cromatografia de troca iônica), observamos que a quantidade de proteína PII foi consideravelmente superior a obtida anteriormente com a outra purificação; indicando que essa proteína poderia ser eficientemente purificada utilizando somente o passo de cromatografia de afinidade. Estes resultados são bastante interessantes uma vez que, pela primeira vez, proteínas PII nativas foram purificadas usando um único passo cromatográfico e alcançaram purezas superiores a 92% ao passo que, proteínas PII de *E. coli*, *H. seropedicae* e outros organismos tem sido purificadas usando três passos cromatográficos: troca iônica, afinidade e gel filtração, alcançando uma pureza não superior a 95-96% (KAMBEROV et al 1994, 1995, BENELLI et al 1997, BONATTO et al 2007).

FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE FRAÇÕES DAS PROTEÍNAS PII NATIVAS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE



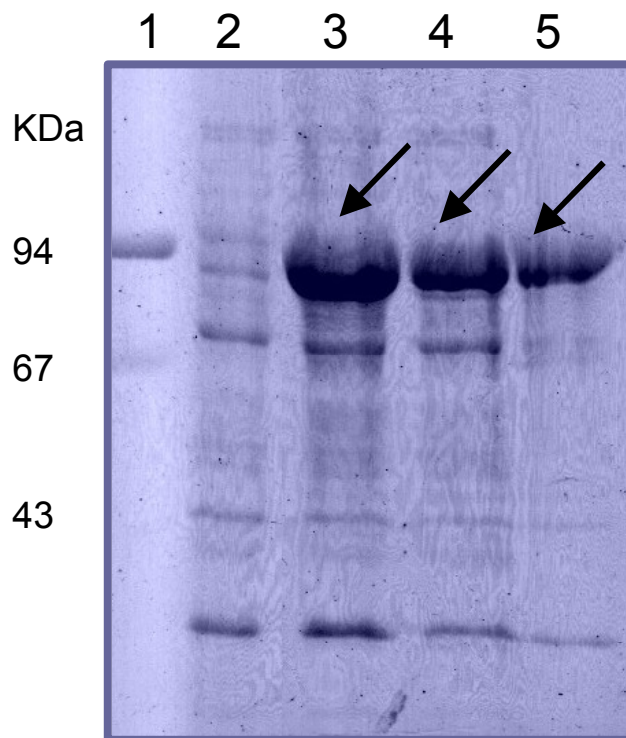
Gel de SDS-PAGE 15% mostrando uma fração das proteínas GlnB (painel A) e GlnZ (painel B) nativas purificadas por cromatografia de afinidade na coluna HiTrap-Heparin (GE Healthcare). M - Padrão de massa molecular em kDa; P - proteínas GlnB (painel A) e GlnZ (painel B) purificadas; C1 - fração solúvel do lisado de *E. coli* transformado com o plasmídeo pT7-7; C2 - fração solúvel do lisado de *E. coli* transformado com o plasmídeo pLMA4 (painel A) e pMSA-L1 (painel B). As estirpes de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS foram induzidas com 0,5 mmol/L IPTG por três horas a 37 °C. Proteínas foram coradas com Coomassie blue. As proteínas GlnB e GlnZ apresentaram 95% e 92% de pureza, respectivamente, como determinado por análise densitométrica.

5.4.2 Expressão e purificação das proteínas GlnD-His e GlnB-His por cromatografia de afinidade

Os plasmídeos pLMA-MLV1 e pALIpGT contendo respectivamente os genes *glnB* e *glnD* de *A. brasilense* clonado no vetor pET28a foram utilizados para superexpressar as proteínas GlnB-His e GlnD-His. A purificação da proteína GlnB-His foi realizada como descrito por ARAÚJO (2004). A proteína GlnD-His foi expressa e purificada de forma bastante semelhante, seguindo o protocolo descrito em materiais e métodos item 4.22.

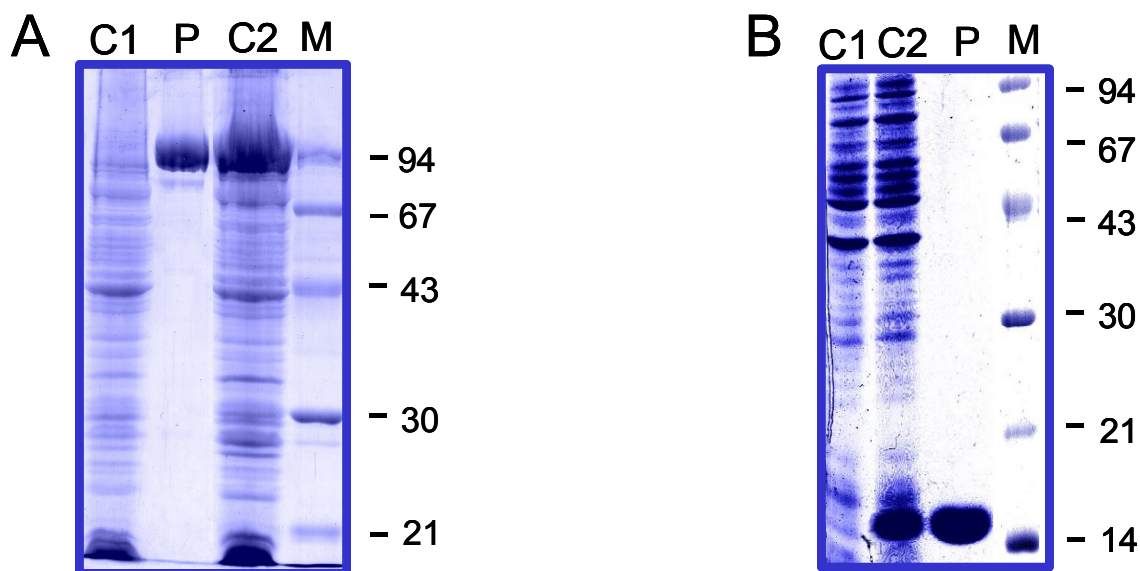
Para obtenção da proteína GlnD-His solúvel não foram necessárias condições especiais, sendo a indução realizada a 30 °C por 4 horas e a presença de DTT 1 mmol/L no tampão de sonicação suficientes para que mais de 60% da proteína expressa fosse encontrada na forma solúvel (Figura 22). Para sua purificação, duzentos e cinquenta mililitros de uma cultura *E. coli* RB9065 (λ DE3) transformada com o plasmídeo pALIpGT foi induzida com IPTG 0,5 mmol/L por 4 horas a 30 °C. O extrato celular, após sonicação, foi aplicado em uma coluna de Hitrap-Chelating-Ni⁺² (GE Healthcare). As proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente de imidazol de 50 a 500 mmol/L. Nessas condições, a proteína GlnD-His foi eluída com aproximadamente 500 mmol/L de imidazol.

A Figura 23 mostra o resultado da purificação das proteínas GlnB-His e GlnD-His utilizando a coluna de afinidade Hitrap-Chelating-Ni⁺² (GE Healthcare). Para avaliar o grau pureza da proteína purificada, o gel foi submetido a uma análise densitométrica e as proteínas GlnD-His e GlnB-His apresentaram 97 e 99% de pureza, respectivamente. As melhores frações obtidas na purificação dessas proteínas foram utilizadas em ensaios de uridililação *in vitro* e, no caso da proteína GlnD-His, também na obtenção de anticorpos policlonais.

FIGURA 22 – PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA GLND-HIS DE *A. brasilense*

Linha 1 – Marcadores de massa molecular em kDa; linha 2 – extrato celular total de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com plasmídeo pET28a e induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L; linha 3 a 5 – respectivamente extrato celular total, solúvel e insolúvel de bactérias BL21 (λ DE3) *pLysS* transformadas com o plasmídeo pALpGT e induzidas por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L. Eletroforese em gel 10% de poliacrilamida na presença de SDS. As setas indicam a região proteína GlnD de *A. brasilense* superexpressa (GlnD-His). As proteínas foram coradas com Coomassie-blue.

FIGURA 23 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS GLNB-HIS E GLND-HIS PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE



Gel SDS-PAGE 10 e 15%, respectivamente mostrando as proteínas GlnD-His (painel A) e GlnB-His (painel B) purificadas por cromatografia de afinidade em coluna Hitrap-Chelating-Ni²⁺. M - Padrão de massa molecular em kDa; P - Proteínas GlnD-His (painel A) e GlnB-His (painel B) purificadas; C1 - fração solúvel do lisado de *E. coli* RB9065 (λ DE3) (painel A) e BL21 (λ DE3) (painel B) transformado com o plasmídeo pET28a; C2 - fração solúvel do lisado de *E. coli* RB9065 (λ DE3) e BL21 (λ DE3) transformado com o plasmídeo pALIpGT (painel A) e pLMA-MLV1 (painel B), respectivamente. As células de *E. coli* foram induzidas com 0,5 mmol/L IPTG por quatro horas a 37°C. Proteínas foram coradas com Coomassie blue. As proteínas GlnD-His e GlnB-His apresentaram 97% e 99% de pureza, respectivamente, como determinado por análise densitométrica.

5.5 URIDILILAÇÃO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS PII DE *A. brasilense*

Uma vez purificada a proteína GlnD-His de *A. brasilense*, ensaios foram realizados a fim de verificar se esta era capaz de uridililar *in vitro* as proteínas PII de *A. brasilense*, GlnB e GlnZ. A proteína GlnD (Utase/UR) possui atividades de uridililtransferase e enzima removedora de uridilil e é a responsável pela alteração do estado conformacional de PII, de acordo com níveis de glutamina/ α -cetogluturato na célula. A proteína PII é uridililada no resíduo de tirosina 51 (Tyr-51) (MERRICK e EDWARDS, 1995).

Os ensaios de uridililação deste trabalho foram realizados como descrito em Material e Métodos itens 4.25 e 4.26. Uma vez uridililada, a proteína PII tem sua massa molecular e principalmente sua carga modificada e esta mudança fica evidente em eletroforese nativa. A introdução do radical UMP nas subunidades do trímero da proteína PII faz com que a proteína migre mais rápido no gel nativo, sendo possível identificar os diferentes estados da proteína (PII livre, PII-(UMP)₁, PII-(UMP)₂, PII-(UMP)₃).

Várias condições de eletroforese não desnaturantes foram testadas para a realização dos ensaios de uridililação (GOLDENBERG, 1989; ATKINSON et al., 1994; FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC, 1994) (dados não mostrados). Dentre estas, as que melhor reproduziram os experimentos foram adaptadas de LAEMMLI et al (1970) e FORCHHAMMER e TANDEAU de MARSAC (1994) (ver Material e Métodos item 4.25).

5.5.1 Efeito do tempo de incubação e da concentração de GlnD-His na uridililação das proteínas PII de *A. brasilense*

Foram realizados experimentos variando o tempo de incubação e a concentração da proteína GlnD de *A. brasilense* na reação de uridililação das proteínas GlnB e GlnZ nativas e GlnB-His. Os resultados desses experimentos podem ser observados nas figuras 24 e 25.

Nos ensaios de variação de concentração, GlnD variou de 0 a 100 nmol/L, sendo que, em baixas concentrações de GlnD (10-20 nmol/L) foram observadas as

quatro formas possíveis de GlnZ e GlnB-His no gel (por exemplo: GlnZ, GlnZ-UMP₁, GlnZ-UMP₂, GlnZ-UMP₃), uma vez que a adição do grupo UMP carregado negativamente aumenta a migração da proteína, como era esperado. Por outro lado, no caso de GlnB, somente duas formas foram observadas nos geis (Figura 24). Esse resultado foi repetido em diferentes experimentos usando diferentes preparações de GlnB e será discutido adiante. Quando foram usados 100 nmol/L de GlnD purificada observou-se que o aumento na quantidade de GlnD gerou um aumento na uridililação das subunidades de PII, alcançando a uridililação total de GlnB e aproximadamente 96% de GlnB-His e GlnZ (Figura 24). Mesmo elevando a concentração de GlnD até 500 nmol/L as proteínas GlnZ e GlnB-His não alcançaram a uridililação total (resultado não mostrado).

Nos ensaios de variação do tempo, não houve modificação significativa no estado de uridililação das proteínas PII nos primeiros 10 minutos de incubação (Figura 25), contudo, após esse tempo, a uridililação de GlnB-His e GlnZ foi consideravelmente mais lenta quando comparada com a uridililação de GlnB. Estendendo-se o tempo de incubação até 60 minutos (resultado não mostrado) não houve alteração no estado das proteínas PII, sendo que GlnB permaneceu totalmente uridililada e GlnB-His e GlnZ não excederam 95% de uridililação. Foram testadas diferentes condições de uridililação, mas em nenhum dos casos foi observado uridililação total das proteínas GlnZ e GlnB-His. Um resultado similar foi observado por ARAUJO et al (2004) usando a proteína GlnD de *E. coli* para uridililar a proteína GlnZ-His de *A. brasilense*. ATKINSON e NINFA (1999) também observaram que a uridililação máxima da proteína GlnK de *E. coli* não excedia 2,5 unidades. Nossos resultados sugerem que diferenças estruturais entre estas proteínas sejam responsáveis pela uridililação incompleta observada em GlnZ. No caso da proteína GlnB-His, o impedimento da cauda His-tag talvez possa, parcialmente, evitar sua completa uridililação. A seqüência His-tag, presente na porção N-terminal em cada subunidade do homotrímero de GlnB-His, poderia sobrepor parcialmente o resíduo de tirosina 51 da subunidade adjacente da proteína (ARCONDEGUY et al 2001). Assim, os demais experimentos de uridililação foram conduzidos somente com a proteína GlnB nativa.

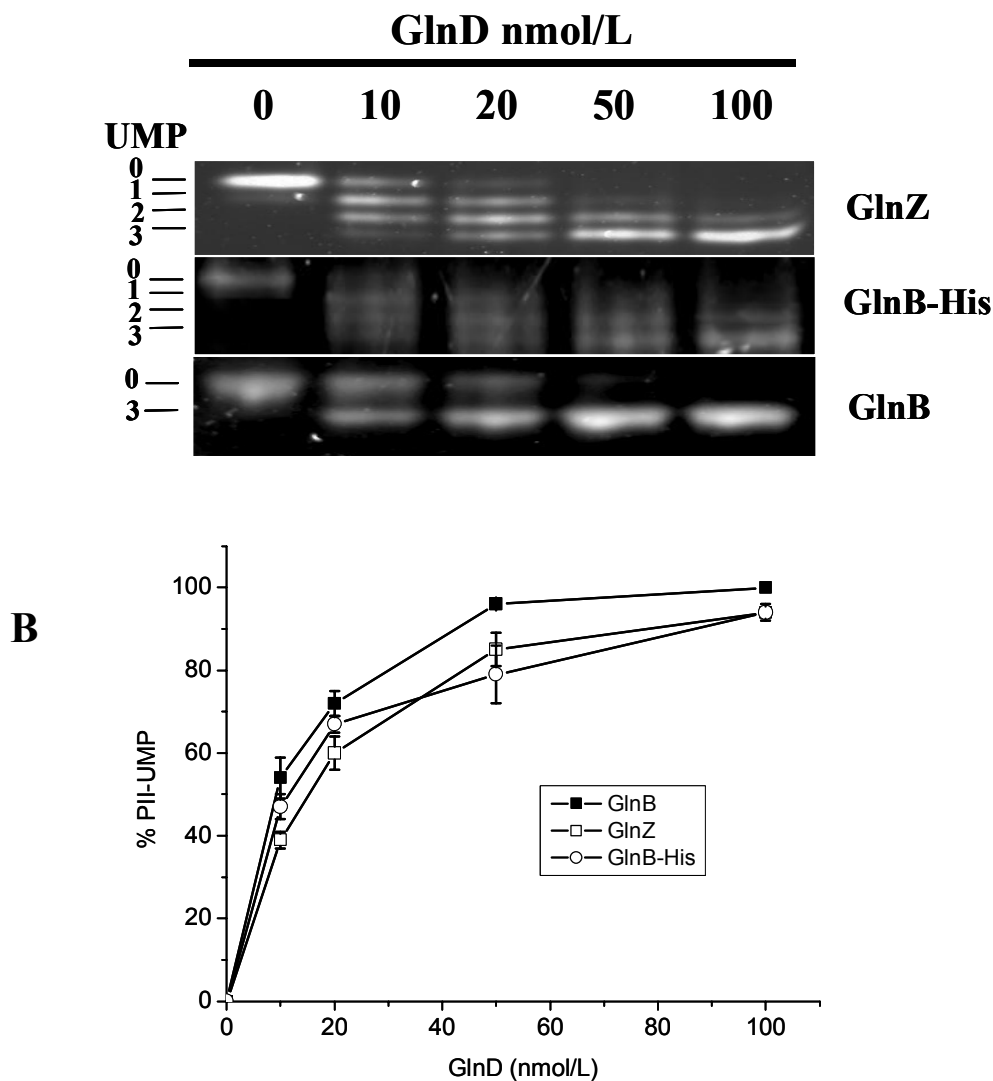
Para checar a natureza das formas da proteína GlnB observada nos geis nativos (Figura 24 e 25), foram executadas análises por espectrometria de massa de

amostras da proteína GlnB antes e depois de ser uridililada. Antes de ser incubada com GlnD, a análise de MALDI-TOF de GlnB gerou um único pico com uma proporção m/z de 12,367 o que está de acordo com a massa molecular predita para o monômero da proteína que é de 12,371 (HUERGO, comunicação pessoal). Após incubação com 100 nmol/L de GlnD, a análise de MALDI-TOF de GlnB gerou um único pico agora com uma proporção m/z de 12,571 (HUERGO, comunicação pessoal), confirmando então que a banda de migração mais rápida, observada no gel após incubação com 100 nmol/L de GlnD, era a banda GlnB-UMP₃. Uma possível explicação para ausência das formas intermediárias de GlnB (GlnB-UMP₁, GlnB-UMP₂) nos géis nativos é que as formas mono-, di- e tri-uridililadas possuam taxas de migração similares e se sobreponham como uma única banda no gel. Como o perfil de migração no gel nativo depende da carga e da conformação protéica, a superposição de GlnB-UMP₁, GlnB-UMP₂ e GlnB-UMP₃ como uma única banda implicaria em uma importante mudança conformacional que contrabalanceasse o efeito da presença dos grupos UMP carregados negativamente. Essa situação parece bastante improvável uma vez que o sítio de uridililação (Tirosina 51) da proteína PII está localizado na volta T, o que o torna bastante flexível e capaz de se estender do núcleo central do trímero de PII (ARCONDEGUY et al 2001). Uma segunda explicação para a ausência de intermediários uridililados de GlnB poderia ser que a uridililação dessa proteína seja um processo cooperativo. Neste caso seria proposto que uma vez que o trímero de GlnB tenha recebido seu primeiro UMP, ele se torne um substrato melhor para adição de outros grupos UMP pela proteína GlnD, de tal forma que a segunda e a terceira modificação ocorram tão rapidamente a ponto de não serem detectadas no sistema utilizado. A presença de somente duas formas de GlnB também foi observada em géis nativos quando a desuridililação e re-uridililação da proteína GlnB de *A. brasilense* foram ensaiadas *in vivo* (HUERGO et al 2006), sugerindo que não somente a uridililação possa ser cooperativa como também a re-uridililação.

O papel fisiológico para a modificação cooperativa de GlnB ainda permanece desconhecido. Vários alvos conhecidos de PII são controlados pelo seu estado de modificação, logo, uma uridililação cooperativa implicaria em uma interação completa ou nula com esses alvos. Tal controle pode ser necessário especialmente nas interações que acontecem de trímero a trímero como aquelas que ocorrem entre

AmtB-GlnB de *A. brasilense* (HUERGO et al., 2007). A proteína AmtB age como um trímero contendo três canais de amônia. A ligação do trímero de PII à face citoplasmática de AmtB inibe a atividade do canal porque a volta T da proteína não uridililada de cada monômero bloqueia um poro do canal AmtB (GRUSWITZ et al., 2007, CONROY et al., 2007). A proteína GlnB parcialmente modificada (por exemplo GlnB-UMP₁ e GlnB-UMP₂) poderia competir com a forma totalmente desuridililada de GlnB na ligação com AmtB mas somente posteriormente iria bloquear de forma eficiente a atividade do canal. Neste caso, uma interação do tipo nula ou total poderia ser essencial.

FIGURA 24 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA PROTEÍNA GlnD NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *Azospirillum brasilense*

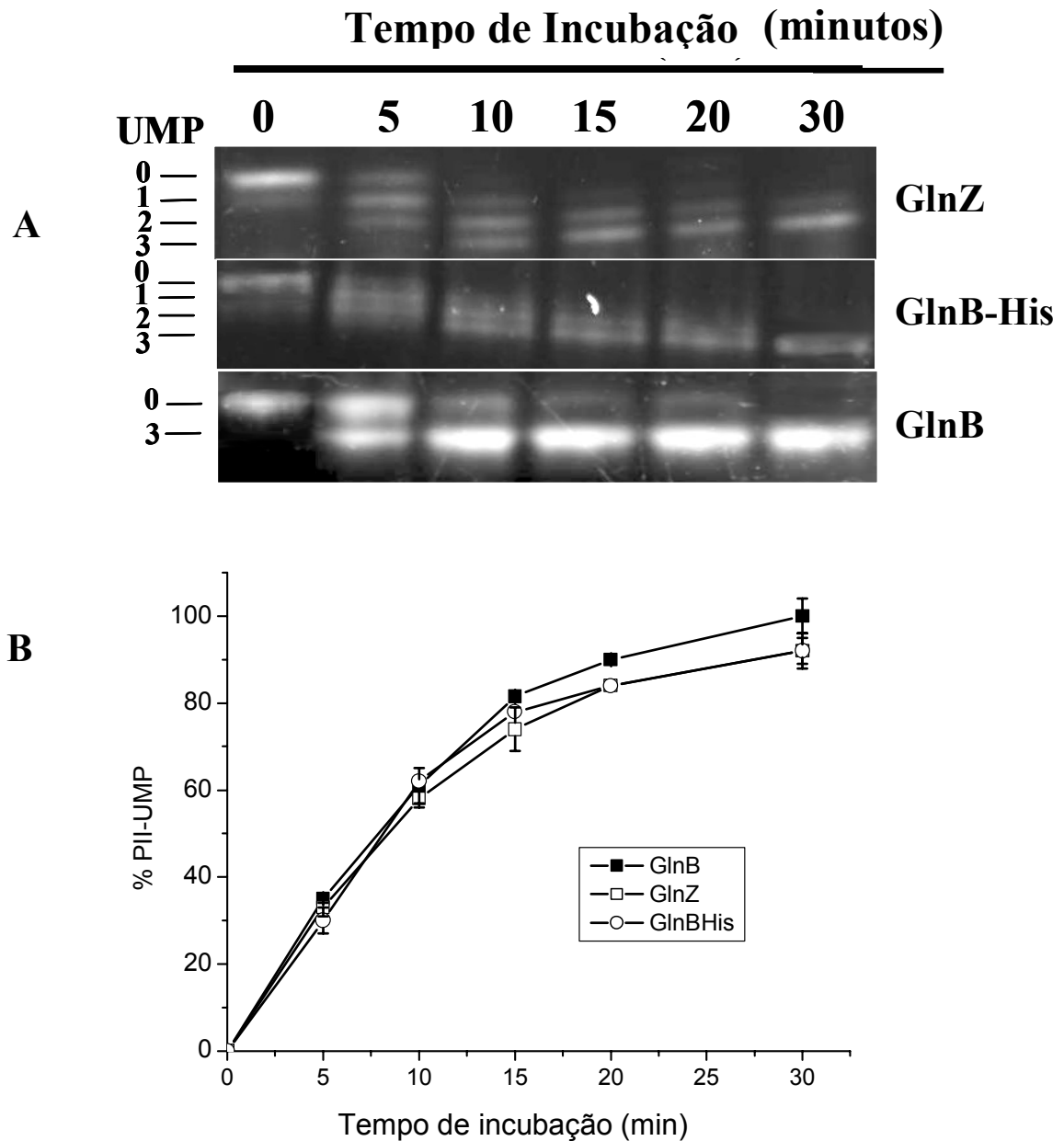


Uridililação das proteínas GlnB, GlnZ e GlnB-His (3 $\mu\text{mol/L}$) de *A. brasilense* pela proteína GlnD de *A. brasilense* (0 a 100 nmol/L) nas concentrações indicadas. As reações foram incubadas por 30 minutos, na presença de ATP 0,1 mmol/L e α -cetoglutarato 10 mmol/L, conforme descrito em Material e Métodos.

Painel A: Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. As proteínas foram coradas com SyproRed.

Painel B: Análise densitométrica obtida das eletroforeses. Os pontos representam a média de experimentos independentes.

FIGURA 25 – EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *Azospirillum brasilense*



Uridililação *in vitro* das proteínas GlnB, GlnZ e GlnB-His (3 $\mu\text{mol/L}$) de *A. brasilense* em diferentes tempos de incubação. As reações foram incubadas na presença da proteína GlnD purificada (100nmol/L), ATP 0,1 mmol/L e α -cetoglutarato 10 mmol/L, conforme descrito em Material e Métodos. Painel A: Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. As proteínas foram coradas com SyproRed.

Painel B: Análise densitométrica obtida das eletroforeses. Os pontos representam a média de experimentos independentes.

5.5.2 Efeito do ATP e α -cetogluturato na uridililação das proteínas PII de *A. brasilense*

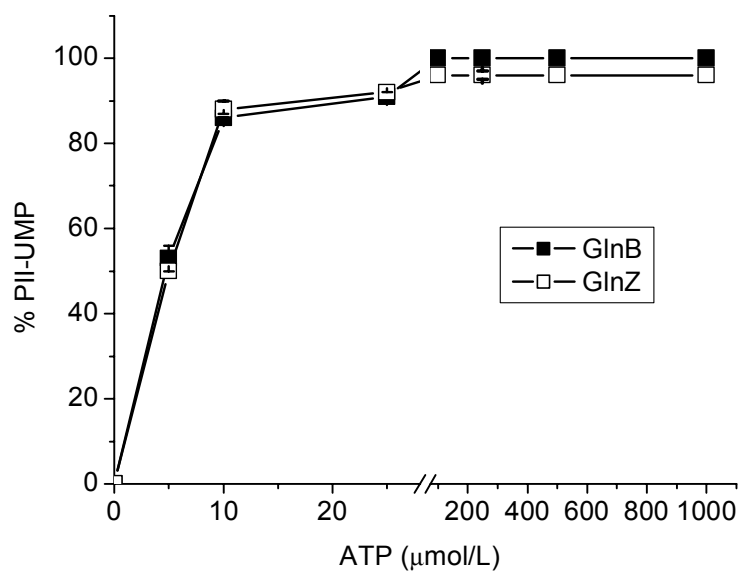
Vários trabalhos têm mostrado que a uridililação das proteínas PII é controlada pelos efetores ATP, α -cetogluturato e glutamina, em inúmeros organismos (ARCONDEGUY et al., 2001, NINFA e ATKINSON 2000). Em *E. coli*, a uridililação de PII requer ATP e α -cetogluturato, e é inibida por glutamina, que por sua vez também estimula o processo de desuridililação da proteína (ADLER et al., 1975, ENGLEMAN et al., 1978, KAMBEROV et al., 1994). PII liga ATP e α -cetogluturato (KAMBEROV et al., 1995, JIANG et al., 1998a) enquanto GlnD liga glutamina (JIANG et al., 1998a).

Para analisar o efeito desses moduladores alostéricos na uridililação das proteínas PII de *A. brasilense*, reações foram conduzidas na presença de concentrações variáveis desses compostos. Os resultados destes ensaios estão presentes na figuras 26 e 27 e indicam que GlnB e GlnZ só são uridililadas na presença de ambos os compostos (ATP e α -cetogluturato). Nenhuma uridililação foi observada na ausência de ATP ou α -cetogluturato, sendo que baixas concentrações desses compostos já foram suficientes para causar alta taxa de uridililação das proteínas. A uridililação máxima de GlnB e GlnZ foi obtida na presença de ATP 0,1 mmol/L e α -cetogluturato 1 mmol/L. Estes resultados sugerem que os efetores, ATP e α -cetogluturato influenciam positivamente a uridililação das proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense*, assim como ocorre com as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* e *H. seropedicae* (KAMBEROV et al., 1994; FORCHHAMMER e TANDEN de MARSAC 1995; BENELLI et al., 2001, BONATTO et al 2007). α -Cetogluturato também é requerido na fosforilação da proteína PII de *Synechococcus* (FORCHHAMMER e TANDEAU DE MARSAC, 1995).

A curva de ATP das proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* foi praticamente idêntica (Figura 26), onde a única diferença observada foi o fato da proteína GlnZ, também neste caso, não ser totalmente uridililada.

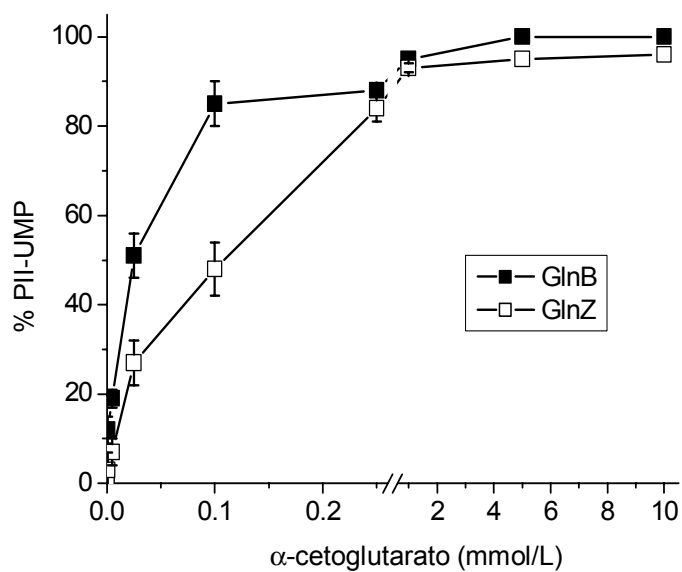
Um resultado interessante foi observado na curva de α -cetogluturato das proteínas GlnB e GlnZ (Figura 27). Nestes experimentos, a taxa de uridililação da proteína GlnB foi, aparentemente, mais eficiente que a da proteína GlnZ em baixas

concentrações de α -cetogluturato (0,001-0,2 mmol/L). Já em concentrações mais elevadas do composto, a curva de uridililação foi bastante semelhante para ambas proteínas. Um resultado similar, porém menos acentuado também foi observado em *E. coli* e *H. seropedicae*, onde a uridililação de GlnB pareceu ser mais eficiente que aquela obtida para GlnK usando as mesmas concentrações de α -cetogluturato (ATKINSON et al., 1999, BONATTO et al., 2007).

FIGURA 26 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ATP NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *A. brasilense*

Uridililação *in vitro* das proteínas GlnB e GlnZ ($3 \mu\text{mol/L}$) de *A. brasilense* pela proteína GlnD de *A. brasilense* purificada em diferentes concentrações de ATP (0-1000 $\mu\text{mol/L}$). As reações foram incubadas por 30 minutos a 30°C , na presença de GlnD (100 nmol/L) e α -cetogluturato 10 mmol/L, conforme descrito em Material e Métodos.

Os dados foram obtidos a partir da análise densitométrica de eletroforese sob condições não desnaturante em gel de poliacrilamida. As proteínas foram corados com SyproRed.

FIGURA 27 - EFEITO DO α -CETOGLUTARATO NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *A. brasilense*

Uridililação *in vitro* das proteínas GlnB e GlnZ (3 μ mol/L) de *A. brasilense* pela proteína GlnD de *A. brasilense* purificada em diferentes concentrações de α -cetoglutarato (0-10 mmol/L). As reações foram incubadas por 30 minutos a 30°C, na presença de GlnD (100 nmol/L) e ATP 0,1 mmol/L, conforme descrito em Material e Métodos.

Os dados foram obtidos a partir da análise densitométrica de eletroforese sob condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida. As proteínas foram corados com SyproRed.

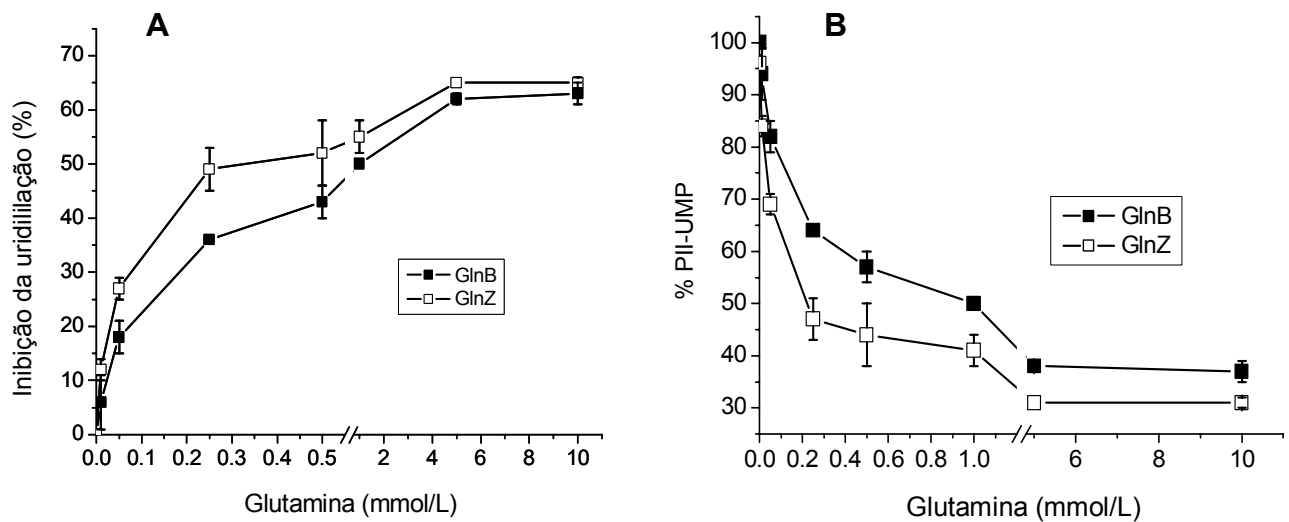
5.5.3 Efeito da glutamina na uridililação e desuridililação das proteínas PII de *A. brasilense*

A atividade da proteína GlnD de *E. coli* está diretamente relacionada com os níveis de glutamina (KAMBEROV et al., 1995, JIANG et al., 1998a), que por sua vez possui uma dupla função: inibir a atividade de uridililtransferase de GlnD e estimular a sua atividade de enzima removedora de uridil (KAMBEROV et al., 1995, JIANG et al., 1998a). Para analisar a influência desse composto na uridililação e desuridililação das proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense*, reações de uridililação foram realizadas variando a concentração de glutamina (0-10 mmol/L). Os resultados obtidos com esses experimentos mostraram que a glutamina inibe a atividade de uridililtransferase da proteína GlnD de *A. brasilense* (Figura 28 A e B), sendo que, aproximadamente 60% da uridililação de ambas, GlnB e GlnZ, foi inibida na presença de 5 mmol/L desse composto. Na presença de 0,2 mmol/L de glutamina a atividade de uridililtransferase de GlnZ foi inibida em aproximadamente 50%, enquanto que a de GlnB, nessa mesma concentração, foi inibida apenas 35%, sugerindo que a glutamina seja mais eficiente na inibição da uridililação de GlnZ. O padrão de inibição por glutamina encontrado para as proteínas PII de *A. brasilense* foi o oposto daquele observado para as proteínas PII de *E. coli*, onde a inibição da uridililação de GlnB por glutamina parece ser mais forte que a de GlnK (ATKINSON et al., 1999). Este padrão também difere daquele encontrado para as proteínas PII de *H. seropedicae*, onde ambas, GlnB e GlnK, apresentaram praticamente o mesmo perfil de inibição (comunicação pessoal).

Para determinar a atividade de enzima removedora de uridilil de GlnD, ambas proteínas, GlnB e GlnZ, foram uridililadas em larga escala, purificadas e usadas como substrato em reações de desuridililação conforme descrito em Material e Métodos (item 4.27). Os resultados obtidos com esses experimentos estão mostrados na figura 29 e indicam que a remoção dos grupamentos UMP por GlnD é totalmente dependente da presença de glutamina. A máxima desuridililação foi alcançada com 10 mmol/L de glutamina, sendo que, a taxa de desuridililação de GlnB em concentrações de glutamina superiores a 0,5 mmol/L foi inferior a taxa de desuridililação de GlnZ nessas mesmas concentrações (Figura 29). Esses resultados sugerem que GlnB-UMP seja um substrato menos eficiente na atividade de remoção

de uridilil/desuridililação de GlnD. Um resultado oposto foi encontrado em *E. coli* (ATKINSON et al., 1999). Neste organismo, a diferença mais óbvia entre GlnB e GlnK é o fato que diferente de GlnB-UMP, GlnK-UMP não é prontamente desuridililada por GlnD (ATKINSON et al., 1999). Nos experimentos realizados com as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense*, foi observado que GlnB-UMP é a proteína que sofre maior atraso no processo de desuridililação.

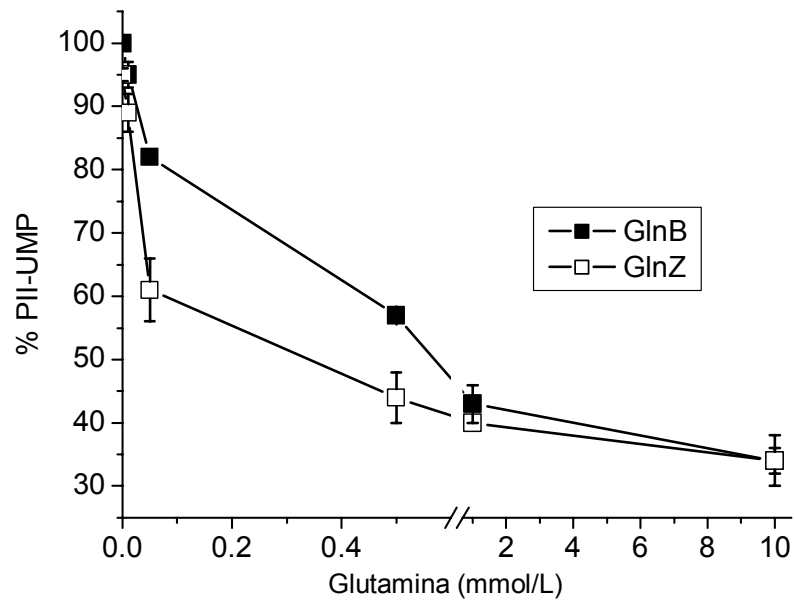
Os resultados dos experimentos desuridililação, juntamente com os de inibição da uridililação sugerem que os níveis de glutamina na célula definem os níveis de uridililação das proteínas PII em *A. brasilense*, e portanto os níveis de nitrogênio na célula. As diferenças encontradas *in vitro* entre as proteínas PII de diferentes organismos provavelmente refletem as diferentes funções e respostas a variações ambientais, bem como a um ajuste refinado nas funções dessas proteínas.

FIGURA 28 - EFEITO DA GLUTAMINA NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII PELA PROTEÍNA GLND DE *A. brasilense*

Efeito da concentração de glutamina (0-10 mmol/L) na uridilação das proteínas GlnB e GlnZ (3 μ mol/L) pela proteína GlnD de *A. brasilense* (100 nmol/L). As reações foram incubadas por 30 minutos a 30°C, na presença de ATP 0,1 mmol/L e α -cetoglutarato 10 mmol/L, conforme descrito em Material e Métodos.

O painel A corresponde a relação do aumento na concentração de glutamina com a porcentagem de inibição da uridilação das proteínas PII ao passo que o painel B corresponde a relação do aumento na concentração de glutamina com a porcentagem de proteínas PII uridiladas.

Os dados foram obtidos a partir da análise densitométrica de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante corados com SyproRed.

FIGURA 29 - EFEITO DA GLUTAMINA NA DESURIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII DE *A. brasilense*

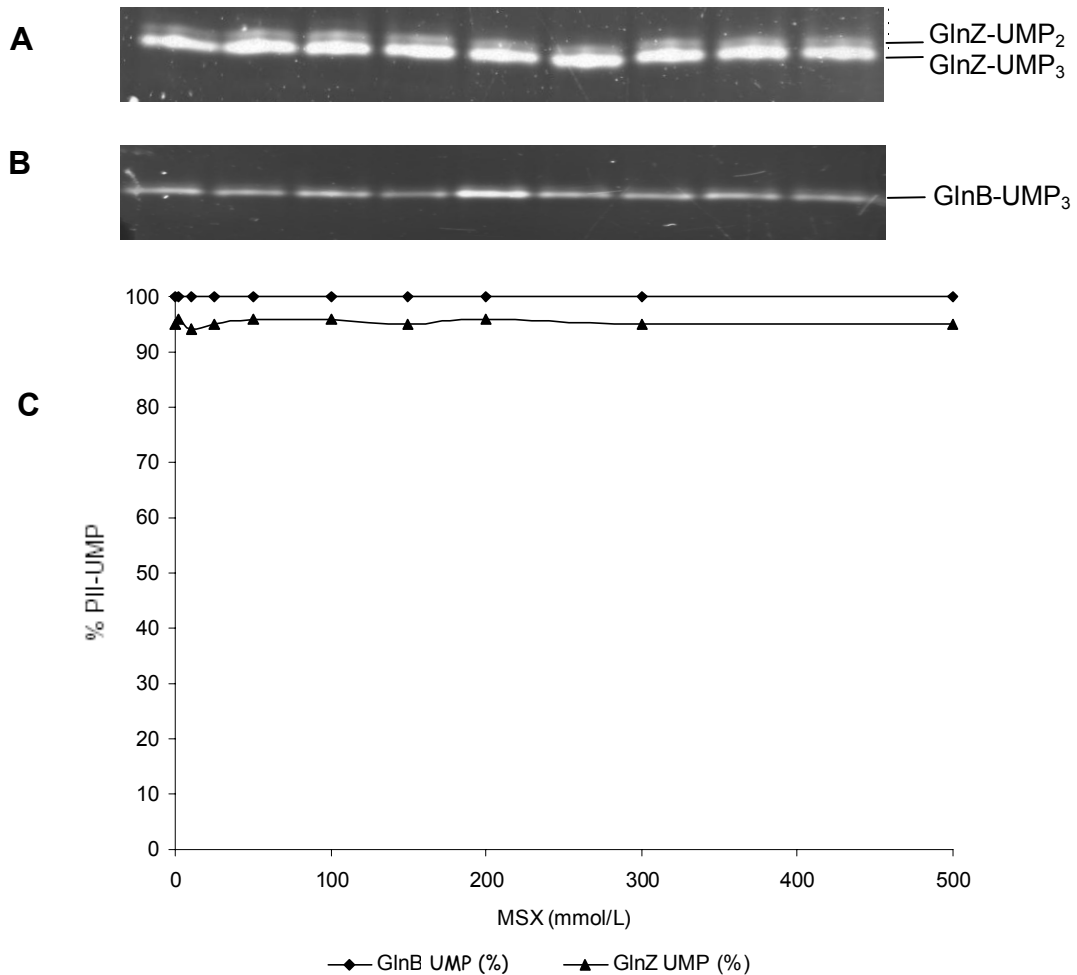
Efeito da concentração de glutamina (0-10 mmol/L) na desuridililação das proteínas GlnB e GlnZ (3 $\mu\text{mol/L}$) pela proteína GlnD de *A. brasilense* (100 nmol/L). As amostras foram inicialmente completamente uridililadas por 30 minutos nas condições ótimas de uridililação, purificadas e então sujeitas as reações de desuridililação na presença de ATP 0,1 mmol/L, α -cetoglutarato 2 mmol/L e GlnD (100 nmol/L), conforme descrito em Material e Métodos (item 4.27). Eletroforese em gel nativo de poliácridamida 10%.

Os dados foram obtidos a partir da análise densitométrica de eletroforese em gel de poliácridamida não desnaturante corados com SyproRed.

5.5.4 Efeito da metionina sulfoximina na uridililação das proteínas PII de *A. brasilense*

A L-metionina-S-sulfoximina (MSX) é um potente inibidor da enzima glutamina sintetase (GS) (DENTON e GINSBURG, 1970, ARP e ZUMFT, 1983, TURPIN et al., 1984). Esta enzima é fundamental na captação de amônia na célula, sendo ela responsável pela catálise da reação que converte o amônio a glutamina (MERRICK e EDWARDS, 1995). Sabe-se que o MSX inibe a glutamina sintetase e a hipótese que esse composto também possa atuar em outras partes do metabolismo do nitrogênio não deve ser descartada (KANEMOTO e LUDDEN, 1987, JAVELLE et al., 2005). Uma possível via de atuação do MSX, que também está intimamente relacionada com o sensoriamento e sinalização dos níveis de amônia, bem como de regulação da GS, é justamente a de (des)uridililação das proteínas PII pela proteína GlnD. Sendo assim, o efeito do MSX foi testado no processo de uridililação e desuridililação das proteínas PII de *A. brasilense*. Para analisar a influência desse composto em ambos processos, reações foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos (item 4.25, 4.26 e 4.27) variando a concentração de MSX (0-500 mmol/L). Os resultados obtidos com esses experimentos estão mostrados na figura 30 e indicam que o MSX não exerce nenhum efeito inibitório tanto na uridililação (Figura 30 A, B e C) como na desuridililação das proteínas PII (dados não mostrados). Um fato interessante, que já havia sido relatado anteriormente, e que se torna bem evidente nesses experimentos é a ausência de uridililação total da proteína GlnZ. Tanto no gel (figura 30 A) como no gráfico (figura 30 C) é possível visualizar que a uridililação máxima de GlnZ não ultrapassa os 95%, corroborando com os resultados anteriores obtidos com os experimentos de uridililação variando tempo, concentração de GlnD, ATP ou α -cetoglutarato.

FIGURA 30 - EFEITO DO MSX NA URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII PELA PROTEÍNA GLND DE *A. brasilense*



Efeito da concentração de MSX (0-500 mmol/L) na uridilação das proteínas GlnZ (painel A) e GlnB (painel B) (3 μ mol/L) pela proteína GlnD (100 nmol/L) de *A. brasilense*. As reações foram incubadas por 30 minutos a 30°C, na presença de GlnD (100 nmol/L), ATP 0,1 mmol/L e α -cetoglutarato 10 mmol/L, conforme descrito em Material e Métodos.

Painéis A e B: Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não desnaturante. As proteínas foram coradas com SyproRed.

Painel C: Análise densitométrica obtida das eletroforeses.

5.6 INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE AS PROTEÍNAS NIFANT-HIS E PII DE *A. brasilense*

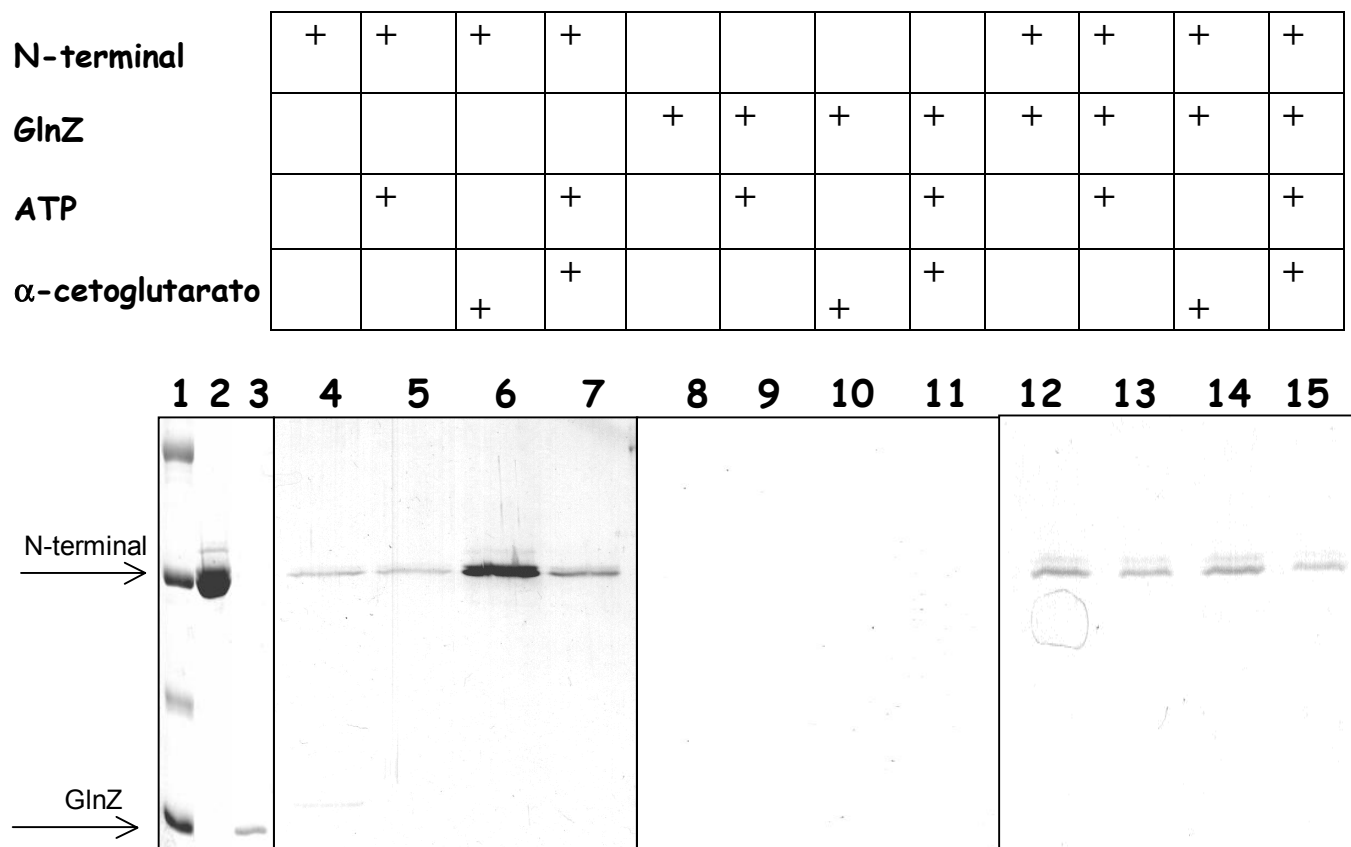
Possíveis interações *in vitro* entre as proteínas GlnB e/ou GlnZ com a proteína NifANT-His foram determinadas por experimentos de “pull-down”. Esses experimentos foram realizados como descrito em Material e Métodos item 4.30 utilizando as proteínas GlnB, GlnZ e NifANT-His purificadas. Inicialmente a proteína NifANT-His foi incubada com “beads” de agarose magnéticas Ni-NTA (Promega), essa resina foi lavada e então as proteínas GlnB, GlnZ ou BSA (controle negativo) foram adicionadas, seguindo uma segunda incubação. Os “beads” foram lavados extensivamente e as proteínas adsorvidas foram eluídas com tampão contendo imidazol 1000 mM. A presença das proteínas NifANT-His, GlnZ e GlnB nas resinas e no eluato foi analisada por SDS-PAGE e posterior coloração com coomassie blue ou prata. A influência da presença ou ausência de ATP (3,5 mmol/L) e/ou α -cetoglutarato (2 mmol/L) também foi analisada, e esses compostos quando presentes foram adicionados aos tampões de incubação/lavagem e eluição.

Baseando-se nos resultados *in vivo* obtidos anteriormente (ARSENE et al 1996, ARAÚJO et al., 2004, de ZAMAROCZY et al., 1998, CHEN et al 2005) esperava-se que a interação ocorresse somente entre NifANT-His e GlnB. Como esperado, a co-eluição da proteína GlnB, mas não de GlnZ, só ocorreu quando as resinas foram pré-incubadas com a proteína NifANT-His (Figura 32). A proteína GlnZ (Figura 31), bem como BSA (dados não mostrados), foram detectados apenas nas lavagens das resinas em todas as condições testadas. A proteína GlnB não foi detectado nas frações de eluição na ausência da proteína NifANT-His. Esses resultados indicam que as proteínas GlnB e NifANT-His são capazes de interagir diretamente *in vitro*. Diferente do observado por LITTLE et al (2002) com as proteínas NifL e GlnK de *A. vinelandii*, em *A. brasilense* a interação das proteínas GlnB e NifANT-His parece não ser dependente dos cofatores ATP e α -cetoglutarato. Em todas as condições testadas, tanto na presença quanto na ausência de ATP e/ou α -cetoglutarato a interação entre as proteínas não foi alterada (Figura 31 e 32). Para analisar se a interação das proteínas era ou não regulada pelos níveis de nitrogênio na célula e pelo estado de uridililação de PII, novos experimentos foram realizados agora utilizando a proteína GlnB completamente uridililada. Para obter a

proteína GlnB completamente uridililada ensaios foram realizados conforme descrito em Material e Métodos item 4.26 e 4.27 utilizando a proteína GlnD de *A. brasilense* purificada. Esses ensaios foram realizados nas condições ótimas de uridililação de GlnB. Em seguida, a reação de uridililação de GlnB foi aplicada em uma coluna de gel filtração (G-25) e eluída como descrito em Material e Métodos item 4.27. A proteína GlnB-UMP proveniente da gel filtração foi então utilizada nos experimentos de “pull down”. A análise do estado de uridililação da proteína GlnB indica que esta estava totalmente uridililada nos experimentos (Figura 32, painel B), e que nesse estado também foi capaz de interagir com NifANT-His, sugerindo que a interação entre essas proteínas ocorra independentemente do estado de uridililação de GlnB (Figura 32).

Esses resultados mostram uma interação direta *in vitro* entre o domínio N-terminal da proteína NifA e a proteína sinalizadora GlnB, mas não com GlnZ. Nossos dados confirmam que em *A. brasilense*, o controle de NifA por nitrogênio é realizado especificamente por GlnB, não existindo aparentemente efeito da proteína GlnZ no processo. Desta forma, esse controle parece ser realizado por uma interação direta entre GlnB e o domínio N-terminal de NifA.

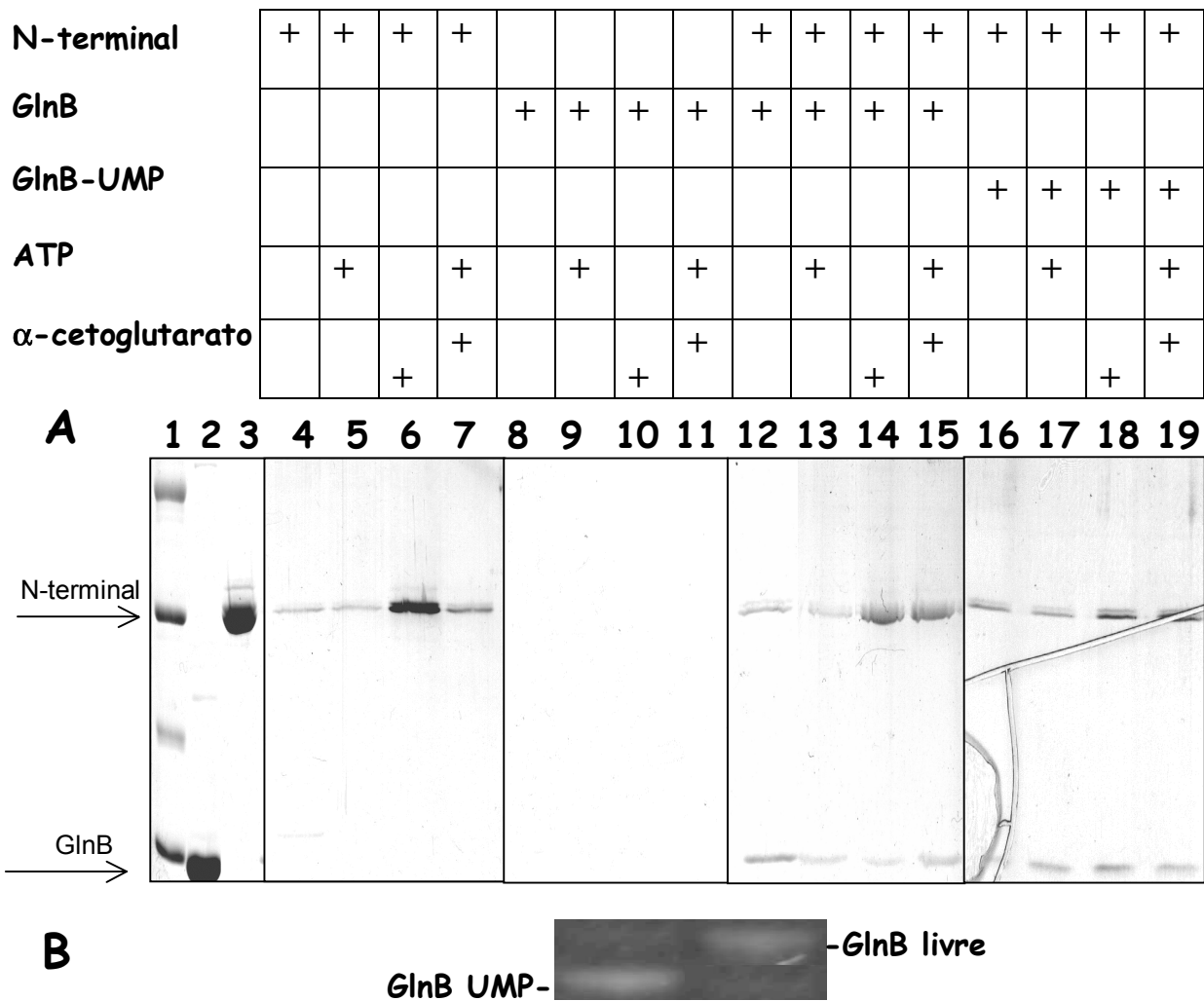
FIGURA 31 – ENSAIOS DE RETENÇÃO DAS PROTEÍNAS NIFANT-HIS E GLNZ DE *A. brasilense*



Ensaio de co-retenção da proteína GlnZ e a porção N-terminal de NifA em resinas de agarose magnéticas Ni-NTA (Promega). Ensaio de “Pull-down” foram conduzidos como descrito em Material e Métodos (item 4.30) e continham o domínio N-terminal His da proteína NifA de *A. brasilense* (0,25 $\mu\text{mol/L}$) imobilizada em resinas de agarose magnéticas Ni-NTA. A proteína GlnZ foi adicionada até uma concentração final de 0,8 $\mu\text{mol/L}$. ATP (3,5 mmol/L) e/ou α -cetogluturato (2 mmol/L) foram adicionados conforme indicado na figura.

As amostras foram analisadas por eletroforese em géis de poliácridamida sob condições desnaturantes 12,5%. As proteínas foram coradas com prata. Linha 1 - Padrão de massa molecular em kDa; linha 2 - proteína NIFANT-His purificada; linha 3 - proteína GlnZ purificada; as demais linhas do gel (4 a 15) correspondem ao perfil eletroforético do experimento de retenção e estão associadas as linhas da tabela sendo que sempre que os compostos (N-terminal, GlnZ, ATP e/ou α -cetogluturato) estavam presentes estes foram representados com o símbolo +.

FIGURA 32 - INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS NIFANT-HIS E GLNB DE *A. brasilense*



Painel A: Ensaio de co-retenção da proteína GlnB e a porção N-terminal de NifA em resinas de agarose magnéticas Ni-NTA (Promega). Ensaio de “Pull-down” foram conduzidos como descrito em Material e Métodos (item 4.30) e continham o domínio N-terminal-His da proteína NifA de *A. brasilense* (0,25 $\mu\text{mol/L}$) imobilizada em resinas de agarose magnéticas Ni-NTA. A proteína GlnB foi adicionada até uma concentração final de 0,8 $\mu\text{mol/L}$. ATP (3,5 mmol/L) e/ou α -cetogluturato (2 mmol/L) foram adicionados conforme indicado na figura. As amostras foram analisadas em eletroforese em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes 12.5%. Esses géis foram corados com prata. Linha 1 - Padrão de massa molecular em kDa; linha 2 - proteína GlnB purificada; linha 3 - proteína NIFANT-His purificada; as demais linhas do gel (4 a 19) correspondem ao perfil eletroforético do experimento de retenção e estão associadas as linhas da tabela sendo que sempre que os compostos (N-terminal, GlnB, GlnB-UMP, ATP e/ou α -cetogluturato) estavam presentes estes foram representados com o símbolo +. Painel B: Gel nativo 10% mostrando a diferença de migração entre a proteína GlnB livre purificada e a proteína GlnB-UMP após uridililação e purificação por gel filtração. Ambas as proteínas foram usadas nos experimentos de interação.

6. CONCLUSÕES

- Neste trabalho realizamos a expressão e purificação das proteínas NifANT-His, NifA-His, GlnD-His e GlnB e GlnZ nativas de *A. brasilense*. As proteínas foram obtidas com grau de pureza de 99, 96, 97, 95 e 92%, respectivamente;
- A proteína GlnD de *A. brasilense* purificada foi capaz de uridililar *in vitro* as proteínas PII desse mesmo organismo;
- As proteínas PII, GlnB e GlnZ, de *A. brasilense* só são uridililadas na presença dos moduladores, ATP e α -cetogluturato;
- A glutamina não só inibe o processo de uridililação das proteínas PII, como é essencial na ativação da desuridililação destas proteínas; A proteína NifANT-His é capaz de interagir *in vitro* com a proteína GlnB de *A. brasilense*; Essa interação é independente dos efetores ATP e α -cetogluturato, e ocorre tanto com a proteína GlnB na forma livre quanto com a proteína uridililada;
- Ensaio de co-retenção mostraram que a proteína GlnB, mas não GlnZ, interage diretamente com o domínio N-terminal de NifA, indicando que o controle de NifA por nitrogênio ocorre através da interação direta com GlnB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. **J. Biol. Chem.**, v.250, n. 16, p. 6264-72, 1975.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAÚJO, L. M. **Clonagem e expressão do gene *glnB* de *A. brasilense***. Curitiba, 2000. 58 f. Monografia (Bacharelado em Biologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ARAÚJO, M. S. **Clonagem e expressão do gene *glnZ* de *A. brasilense***. Curitiba, 2000. 57 f. Monografia (Bacharelado em Biologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ARAÚJO, L. M. **Purificação e caracterização da proteína GlnB de *Azospirillum brasilense***. Curitiba, 2003. 100 f. Dissertação (mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ARAÚJO, L. M. **Purificação e caracterização da proteína GlnZ de *Azospirillum brasilense***. Curitiba, 2003. 92 f. Dissertação (mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ARAÚJO, L. M.; BENELLI, E. M.; BAURA, V.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L.S. Effect of ATP, Glutamine and α -Ketoglutarate Concentrations in the *In Vitro* Uridylylation of the GlnB Protein of *Azospirillum brasilense* Strain FP2. In: XXXIV^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2005, Águas de Lindoia. **Resumos...** Águas de Lindoia, 2005.

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

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

ARAVIND, L. PONTING, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v. 12, p. 458-9, 1997.

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

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

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

ARP D. J.; ZUMFT W. G. L-methionine-SR-sulfoximine as a probe for the role of glutamine synthetase in nitrogenase switch-off by ammonia and glutamine in *Rhodospseudomonas palustris*. **Arch Microbiol.** v.134(1), p. 17-22, 1983.

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

ARSÉNE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P(II): effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 179, n. 2, p. 339-343, 1999.

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 transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 28288-28293, 1994.

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

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

ATKINSON, M. R.; BLAUWKAMP, T. A.; BONDARENKO, V.; STUDITSKY, V.; NINFA, J. A. Activation of the *glnA*, *glnK*, and *nac* promoters as *Escherichia coli* undergoes the transition from nitrogen excess growth to nitrogen starvation. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5358-5363, 2002 (a).

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

AUSTIN, S.; HENDERSON, N.; DIXON, R. Characterization of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NIFA and NIFL *in vitro*. **Eur. J. Biochem.**, v. 187, p. 353-360, 1990.

BACKMAN, K.; CHEN, Y. M.; MAGASANIK, B. Physical and genetic characterization of the *glnA-glnG* region of the *Escherichia coli* chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3743-3747, 1981.

BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. **J. Appl. Bacteriol.**, v.53, p. 399-403, 1983.

BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B.; MORETT, E. Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. **Nucleic. Acids. Res.** v. 27, p. 4305-4313, 1999.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 103-121, 1997.

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

BENELLI, E. M. **Análise funcional e estrutural da proteína controladora dos sistemas Ntr e Nif, a proteína PII de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 1997. 201 f. Tese (doutorado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.** v. 47, n. 4, p. 309-14, 2001.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to enteric GlnK. **Eur. J. Biochem.** v. 269, n. 13, p. 3296-3303, 2002.

BERGER, D. K.; NARBERHAUS, F.; LEE, H. S.; KUSTU, S. In vitro studies of the domains of the nitrogen fixation regulatory protein NIFA. **J. Bacteriol.** v. 177(1), p.191-9, 1995.

BLAUWKAMP, T. A.; NINFA A. J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. **Mol. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 203–214, 2002.

BLOOM, F. R.; LEVIN, M. S.; FOOR, F.; TYLER, B. Regulation of glutamine synthetase formation in *Escherichia coli*: characterization of mutants lacking the uridylyltransferase. **J. Bacteriol.** v. 134, p. 569-577, 1978.

BLUM, H., BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels. **Electrophoresis** v. 8. p. 93-99, 1987.

BONATTO, A. C.; COUTO, G. H.; SOUZA, E. M.; ARAÚJO, L. M., PEDROSA, F. O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E. M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expr Purif.** v. 55(2), p.293-9, 2007.

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

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

BUCK, M. Deletion analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: importance of spacing between conserved sequences around positions –12 and –24 for activation by the *nifA* and *ntrC* (*glnG*) products. **J. Bacteriol.** v. 166, p. 545-551, 1986.

BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 164, p. 816-822, 1985.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, p. 195-203, 1981.

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

CHEAH, E.; CARR, P. D.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. **Structure.** v. 2(10), p. 981-90, 1994.

CHEEMA, A. K.; CHOUDHURY, N. R.; DAS, H. K. A- and T- tract-mediated intrinsic curvature in native DNA between the binding site of the upstream activator NtrC and the *nifLA* promoter of *Klebsiella pneumoniae* facilitates transcription. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 5296-5302, 1999.

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

COLNAGHI, R.; RUDNICK, P., HE, L.; GREEN, A.; YAN, D.; LARSON, E.; KENNEDY, C. Properties of the *Escherichia coli* rhodanese-like protein SseA: contribution of the active-site residue Ser240 to sulfur donor recognition. **FEBS Lett.** v. 500(3), p.153-6, 2001.

COMMICHAU, F. M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. **Curr Opin Microbiol.** v. 9(2), p. 167-72, 2006.

CONROY, M. J.; DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X. D.; BULLOUGH, P. A.; WINKLER, F. K.; MERRICK, M. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 104(4) p. 1213-8, 2007.

CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M.; BALI, A.; BLANCO, G.; GARCIA, E.; BUSH, G.; KENNEDY, C.; MERRICK, M. The product of the nitrogen fixation regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 24, p. 7741-9, 1991.

CRUZ L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 5, p. 2375-9, 2001.

DEAN, D.R.; BOLIN, J. T.; ZHENG, L. Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6737-6744, 1993.

DEAN, D. R.; JACOBSEN, M. R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 763–834.

DEKHIL, B. S.; CAHILL, M.; STACKEBRANT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomibilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. Nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *paroensis* to the new type species of *Conglomeromonas*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 72-77, 1997.

de MEL, V. S. J.; KAMBEROV, E. S.; MARTIN, P. D.; ZHANG, J.; NINFA, A. J.; EDWARDS, B. F. P. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, v.243, p. 796-798, 1994.

DENTON MD, GINSBURG A. Some characteristics of the binding of substrates of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Biochemistry**. v. 9(3), p. 617-32, 1970.

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

de ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 224, p. 421-430, 1990.

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

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

DILWORTH, M. J.; Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Bioch. Biophys. Acta.** v. 127, p.285-294, 1966.

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

DIXON, R.; KENNEDY, C.; KONDOROSI, A.; KRISHNAPILLAI, V.; MERRICK, M. Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. **Mol. Gen. Genet.**, v. 157, p. 189-198, 1977.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A.; TRUPPER, H. G.; DWORKING, M.; HARDER, W. **The Prokaryotes**. Springer-Verlag 2 ed. vol III., 1991. p.2236-3353.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. (Eds). Proc. of the 1st. Intl. Symp. **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington Univ. Press, 1976. v.2, p.518-38.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Springer-Verlag: Science Tech Publishers, 1987.

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

EADY, R. R. Enzymology of free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J.; PÜHLER, A., (Eds). **Nitrogen fixation**. Oxford: Clarendon Press, 1986. v. 4, p. 1-49.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium

associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 1, p. 17-26, 2001.

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

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

ETTO, R. M.; Mutagênese Sítio-Dirigida da Proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2003. 42 f. Monografia (Bacharelado em biologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FADEL-PICHETH, C. M.; 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, n. 2, p. 281-8, 1999.

FANCELLI, S.; FANI, R.; GRIFONI, A.; MUGNAI, M.; PASTORELLI, R.; BAZZICALUPO, M. Control of *nifH* transcription in *Azospirillum brasilense*: involvement of NifA and of cis-acting sequences. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 115, n. 1, p. 57-62, 1994.

FENG, J. L.; GOSS, T. J.; BENDER, R. A.; NINFA, A. J. Activation of transcription initiation from the *nac* promoter of *Klebsiella aerogenes*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5523-5534, 1995.

FISCHER, H-M. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol. Rev.**, v. 58, p. 352-386, 1994.

FISCHER, H-M.; HENNECKE, H. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular status. **Mol. Gen. Genet.**, v. 209, p. 621-626, 1987.

FISCHER, H-M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucl. Acids Res.**, v. 16, p. 2207-2224, 1988.

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

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

FU, H.; BURRIS, R. H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3168-3175, 1989.

GALIMAND, M.; PERROUD, B.; DELORME, F.; PAQUELIN, A.; VIELLE, C.; BOZOUKLIAN, H.; ELMERICH, C. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifUS* and *fixABC* *Azospirillum brasilense* Sp7. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, p. 1047-1059, 1989.

GARCIA, E.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 4, p. 2246-53, 1983.

GOLDENBERG, D. P.. Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. In: CREIGHTON, T. E. (Ed.). **Protein Structure, a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989.

GONZALEZ, V.; OLVERA, L.; SOBERON, X.; MORETT, E. *In vivo* studies on the positive control function of NifA: a conserved hydrophobic amino acid patch at the central domain involved in transcriptional activation. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 55–67, 1998.

GRUSWITZ F, O'CONNELL J 3RD, STROUD RM. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 104(1), p. 42-7, 2007.

GUNARTO, L.; ADACHI, K.; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. From a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biol. Fertil. Soils**, v. 28, p. 129-136, 1999.

HARTMANN, A. E.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 944-8, 1987.

HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.** v. 165, p. 864-870, 1986.

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

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

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, J. A.; KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting condition. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6661-7, 1998.

HILL, S.; KENNEDY, C.; KAVANAGH, E. Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *K. pneumoniae*. **Nature**, v. 290, p. 424-426, 1981.

HO, Y.S.; BURDEN, L.M.; HURLEY, J.H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J.** v. 19, p. 5288-5299, 2000.

HOLGUIN, G.; PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. **Biol. Fertil. Soils**, v. 41, n. 3, p. 281-288, 1999.

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

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 63, p. 235-64, 1994.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.

HUERGO, L. F. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *A. brasilense***. Curitiba, 2006. 170 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

HUERGO, L. F., FILIPAKI, A., CHUBATSU, L. S., YATES, M. G., PEDROSA, F. O. SOUZA, E. M. Effects of the PII and PZ proteins over-expression in the nitrogen metabolism of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 253, p. 47-54, 2005.

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

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B.; 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. 223(1), p. 33-40. 2003.

HUNT, T. P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 8453-8457, 1985.

INVITTI, A. L.; REGO, F. G. M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.. Cloning and overexpression of the *rpoC* gene of *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXXIII^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004, Caxambu. **Livro de Resumos da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq**. Caxambu, 2004.

ISHIDA, M. L. **Construção e análise fisiológica de plasmídeos recombinantes capazes de expressar o gene *nifA* de *A. brasilense***. Curitiba, 1996. 100 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ISHIDA, M. L.; ASSUMPÇÃO, M. L.; MACHADO, E. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Identification and characterization of two-components NtrX/NtrY regulatory system in *Azospirillum brasilense*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 651-661, 2002.

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

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

JIANG, P.; NINFA, A. J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 6, p. 1906–1911, 1999.

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

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

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

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. **Mol. Cell. Biol. Res.**, v. 40, p. 175-191, 1994.

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

KANACHER, T.; SCHULTZ, A.; LINDER, J. U.; SCHULTZ, J. E. A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. **EMBO J.** v. 21(14), p. 3672-80, 2002.

KANEMOTO, R. H.; LUDDEN, P. W. Amino acid concentrations in *Rhodospirillum rubrum* during expression and switch-off of nitrogenase activity. **J Bacteriol.** v. 169(7), p. 3035-43, 1987.

KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 4976-4980, 1988.

KHAMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.**, v. 140, p. 45-55, 1989.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, p. 389-397, 1994.

KLASSEN, G.; SOUZA, E. M.; YATES, G. M.; RIGO, L. U.; INABA, J.; PEDROSA, F. O. Control of nitrogenase reaction by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 22, p. 6710-6713, 2001.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M. Construction of multicopy expression vectors for regulated over production of protein in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 1779-1784, 1988.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.

KUSTU, S.; HIRSHMAN, J.; BURTON, D.; JELESKO, J.; MEEKS, J. C. Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. **Mol. Gen. Genet.**, v. 197, p. 309-317, 1984.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiol. Rev.**, v.53, p. 367-376, 1989.

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

LEE, H. S.; BERGER, D. K.; KUSTU, S. Activity of purified NIFA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 90(6), p. 2266-70, 1993.

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. **Annu Rev Microbiol.** v. 61, p. 349-77, 2007.

LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense*. Their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Mol. Gen. Genet.**, v. 240, p. 188-196, 1993.

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

LIANG, J. H.; NIELSEN, G. M.; LIES, D. P.; BURRIS, R. H.; ROBERTS G. P.; LUDDEN, P. W. Mutations in the *draT* and *draG* genes of *Rhodospirillum rubrum* result in lost of the regulation of the nitrogenase by reversible ADP-ribosylation. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 6903-6909, 1991 (b).

LIANG, Y. Y.; de ZAMAROCZY, M.; ARSENE, F.; PAQUELIM, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 100, p. 113-120, 1992.

LITTLE, R.; DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **J Biol Chem.** V. 278(31), p. 28711-8, 2003.

LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; van HEESWIJK, W. C.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. **EMBO J.**, v. 19, n. 22, p. 6041-50, 2000.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n.18, p.15472-81, 2002.

LOPEZ-DE-VICTORIA, G.; LOVELL, C. R. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p. 2951-2955, 1993.

LOPEZ-DE-VICTORIA, G.; FIELDER, D. R.; ZIMMER-FAUST, R. K.; LOVELL, C. R. Motility behavior of *Azospirillum* species in response to aromatic compounds. **Can. J. Microbiol.**, v. 40, p. 705-711, 1994.

LOWERY, R. G., L. L. SAARI; P. W. LUDDEN. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation *in vitro*. **J. Bacteriol.** v. 166, p. 513-518, 1986.

LUDDEN, P. W. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 138, p. 023-029, 1994.

LUDDEN, P. W.; LEHMAN, L.; ROBERTS, G. P. Reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in a *nifD*- mutant of *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 9, p. 5210-1, 1989.

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

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.

MACPHERSON, K. H.; XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; LUQUE, E.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Escherichia coli* GlnK. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** V. 54(Pt 5), p. 996-8, 1998.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Ann. Acad. Bras. Cienc.**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAGASANIK, B. Regulation of transcription of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* by protein phosphorylation. **Biochem.**, v. 71, p. 1005-1012, 1989.

MARTIN-DIDONET, C.C.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; KLEINA, M.; REGO, F. G.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Genome structure of the genus *Azospirillum*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 14, p. 4113-6, 2000.

MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Distinct roles of PII-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and postranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. **J. Bacteriol.** v. 184, p. 2251-2259, 2002.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W.; PÜHLER, A. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 212, p. 27-37, 1988.

MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single strand DNA "blue" T7 promoter plasmids a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. **Prot. Eng.**, v.1, p. 67-74, 1986.

MERRICK, M. J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. **EMBO J.**, v. 2, p. 39-44, 1983.

MERRICK, M. J. Organisation and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; de BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1988. p. 293-302.

MERRICK, M. J. A new model for nitrogen control. **Nature**, v. 297, n. 5865, p. 362-3, 1982.

MERRICK, M. J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes. In: PALACIO, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. (Eds.). **New horizon in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1993. p. 1-12.

MERRICK, M.J. Nitrogen control of nitrogen fixation in free-living diazotrophs, In: KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; GALLON, J.R.; NEWTON, W.E. **Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria**. Amsterdam, p. 97-223, 2004.

MERRICK, M.; CHAMBERS, S. The helix-turn-helix motif of sigma 54 is involved in recognition of the -13 promoter region. **J. Bacteriol.**, v. 174 n. 22, p. 7221-6, 1992.

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

MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, M.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Mol.Gen.Genet.**, v.185, p.75-81, 1982.

MISSAILLIDIS, S.; JASEJA, M.; RAY, P.; CHITTOCK, R.; WHARTON, C. W.; DRAKE, A. F.; BUCK, M.; HYDE, E. I. Secondary structure of the C-terminal DNA-binding domain of the transcriptional activator NifA from *Klebsiella pneumoniae*: spectroscopic analyses. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 361, p. 173-182, 1999.

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(3), p. 289-98, 1996.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 447, p. 283-286, 1999 (a).

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. *In-trans* regulation of the N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p. 157-161, 1999 (b).

MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B.; CHUBATSU, L. S. Isolation of recombinant plasmids for rapid analysis using a sodium dodecyl sulfate/potassium chloride precipitation. **Anal Biochem.**, v. 292, n. 1, p. 169-70, 2001.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, G. M.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression, purification, and functional analysis of the C-terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Expr Purif.** V. 27(2), p. 313-8, 2003.

MORETT, E.; CANNON, E. W.; BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognizes the upstream activator sequence of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic. Acids Res.**, v. 16, p. 11469-11488, 1988.

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action of phylogenetic relationship of their functional domains. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6067-6074, 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 Research and Rehabilitation**, v.1, p. 115-127, 1987.

NINFA, A.J ATKINSON, E. S. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 172-9, 2000.

NINFA, E. G.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; NINFA, A. J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 7024-7032, 1993.

NINFA, A. J.; BENNETT, R. L. Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 6888-6893, 1991.

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

NOINDORF, L.; REGO, F. G.; BAURA, V. A.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch Microbiol.** v. 185(1), p. 55-62, 2006.

NORDLUND, S.; Regulation of nitrogenase activity in phototrophic bacteria by reversible covalent modification. **Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of a biological process.** Horizon Scientific Press, 2000.

O'CONNELL, K. P.; RAFFEL, S. J.; SAVILLE, B. J.; HANDELSMAN, J. Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants. **Microbiology.** v. 144 (Pt 9), p. 2607-17, 1998a.

O'CONNELL M, NOEL TC, YEUNG EC, HYNES M, HYNES MF. Decreased symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* strains carrying plasmid RP4. **FEMS Microbiol Lett.** v. 161(2), p. 275-83, 1998b.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v. 63, p. 366-370, 1997.

PASSAGLIA, L. M.; NUNES, C. P.; ZAHA, A.; SCHRANK, I. S. The *nifHDK* operon in the free-living nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* sequentially comprises

genes H, D, K, an 353 bp orf and gene Y. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, n. 7, p. 649-75, 1991.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 900, 1983.

PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; de BRUIJN, F. J. Characterisation of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 124-138, 1991.

PEDROSA, F.O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência hoje**, v. 6, p.12-13, 1987.

PEDROSA, F. O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 55, p. 95-101, 1984.

PLAZINSKI, J.; DART, P. J.; ROLFE, B. G. Plasmid visualization and *nif* gene location in nitrogen-fixing *Azospirillum* strains. **J. Bacteriol.**, v. 155, n. 3, p. 1429-33, 1983.

PORTER, S.C.; NORTH, A.K.; KUSTU, S. Mechanism of the transcription activation by NtrC. In: HOCH, J, A.; SILHAVY, T.J. (Ed.). **Two-component signal transduction**. ASM Press. Washington D.C., 1995.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. p.375-85.

RATET, P.; PAWLOWSKI, K.; SCHELL, J.; de BRUIJN F. J. The *Azorhizobium caulinodans* nitrogen-fixation regulatory gene, *nifA*, is controlled by the cellular nitrogen and oxygen status. **Mol. Microbiol.**, v. 3, p. 825-838, 1989.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.**, v. 162, p. 190-195, 1985.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; de LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing

organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 37, p. 43-51, 1987.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 1979-1983, 1985.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 10, p. 3076-82, 2001.

REYES-RAMIREZ F, LITTLE R, DIXON R Mutant forms of the *Azotobacter vinelandii* transcriptional activator NifA resistant to inhibition by the NifL regulatory protein. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 24, p. 6777-85, 2002.

ROBERTS, G. P.; MacNEIL, T.; MacNEIL, D.; BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 136, n. 1, p. 267-279, 1978.

RUDNICK, P.; KUNZ, C.; GUNATILAKA, M. K.; HINES, E. R.; KENNEDY, C. Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 3, p. 812-20, 2002.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTERO, E.; HOOVER, T.; KEENER, J.; KUSTU, S. *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 7346-7350, 1989.

SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHELESSMAN, J.; HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structure of ADP-AIF₄⁻-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature**, v.387, p. 370-376, 1997.

SCHLÜTER, A.; NÖHLEN, M.; KRÄMER, M.; DEFEZ, R.; PRIEFER, U. B. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* *glnD* gene, encoding a

uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme, is expressed in the root nodule but is not essential for nitrogen fixation. **Microbiology**. v. 146 (Pt 11), p. 2987-96, 2000.

SCHÖLLHORN, R.; BURRIS, R. H. Reduction of azide by the N₂-fixing enzyme system. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 57(5), p. 1317-23, 1967.

SENIOR, P.J. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous culture technique. **J. Bacteriol.** v. 123, p. 407-410, 1975.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **BioTechnology**. v.1, p. 784-791, 1983.

SINGH, M.; TRIPATHI, A. K.; ROBERTS, G. P. Identification of a regulatory *nifA* type gene and physical mapping cloned new *nif* regions of *A. brasilense*. **Mol. Gen. Genet.**, v.219, p. 235-240, 1989.

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

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

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

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRLJI. **Plant Mol. Biol.** v. 9, p. 27-39, 1987.

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

STIGTER, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F. J. *Azorhizobium caulinodans* nitrogen fixation (*nif/fix*) gene regulation: mutagenesis of the *nifA* -24/-12 promoter element, characterization of a *ntrA* (*rpoN*) gene, and derivation of a model. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 6, n. 2, p. 238-52, 1993.

TARRAND, J. J., KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions 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, n. 8, p. 967-80, 1978.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** V. 25(24), p. 4876-82, 1997.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology an introduction.** Nova York: Benjamin/Cummings Publishing Company, inc., 1995. p.664-673.

TURPIN, D. H.; EDIE, S. A.; CANVIN, D. T. *In Vivo* Nitrogenase Regulation by Ammonium and Methylamine and the Effect of MSX on Ammonium Transport in *Anabaena flos-aquae*. **Plant Physiol.** V. 74(3), p. 701-704, 1984.

VANDE BROEK, A.; MICHIELS, J.; de FARIA, S. M.; MILCAMP, A.; VANDERLEYDEN, J. Transcription of the *Azospirillum brasilense nifH* gene is positively regulated by NifA and NtrA and is negatively controlled by the cellular nitrogen status. **Mol. Gen. Genet.**, v. 232, n. 2, p. 279-83, 1992.

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, n. 5, p. 813-20, 2002

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

van HEESWIJK, W.; KUPPINGER, O.; MERRICK, M.; KAHN, D. Localization of the *glnD* gene on a revised map of the 200-kilobase region of the *Escherichia coli* chromosome. **J Bacteriol.** v. 174(5), p. 1702-3, 1992.

van HEESWIJK, W. C.; STEGEMAN, B.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An additional PII in *Escherichia coli*: a new regulatory protein in the glutamine synthetase cascade. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 132 n. 1-2, p. 153-7, 1995.

van HEESWIJK, W. C.; WEN, D.; CLANCY, P.; JAGGI, R.; OLLIS, D. L.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers *in vivo*: fine tuning the nitrogen signal cascade. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 97, n. 8, p. 3942-7, 2000.

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*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 201, p. 199-204, 2001.

WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, v. 35, n. 4, p. 756–764, 2000.

WASSEM, R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; REGO, F. G.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol Lett.** v. 212(2), p. 177-82, 2002.

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

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A.; JOSEPH, C. M.; MEEKS, J. C. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **J. Bacteriol.** v. 169, p. 4211-4214, 1987.

WÖSTEN, M. M. Eubacterial sigma-factors. **FEMS Microbiol Rev.** v. 22(3), p. 127-50, 1998.

XIE, C.H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 55, p. 1435-1438, 2005.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P.D.; VAN HEESWIJK, W.C.; WESTERHOFF, H.V.; VASUDEVAN, S.G.; OLLIS, D.L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP

binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J Mol. Biol.** v. 282, p. 149-165, 1998.

YATES, M. G. The enzymology of molybdenum-dependent nitrogen fixation. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman e Hall, 1992. p. 685-735.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman e Hall, New York, 1992. p.43-86.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 6781-6788, 1993.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense ntrBC* mutants: ammonium and anaerobic switch-off occurs through independent signal transduction pathways. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 5780-5787, 1994.

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

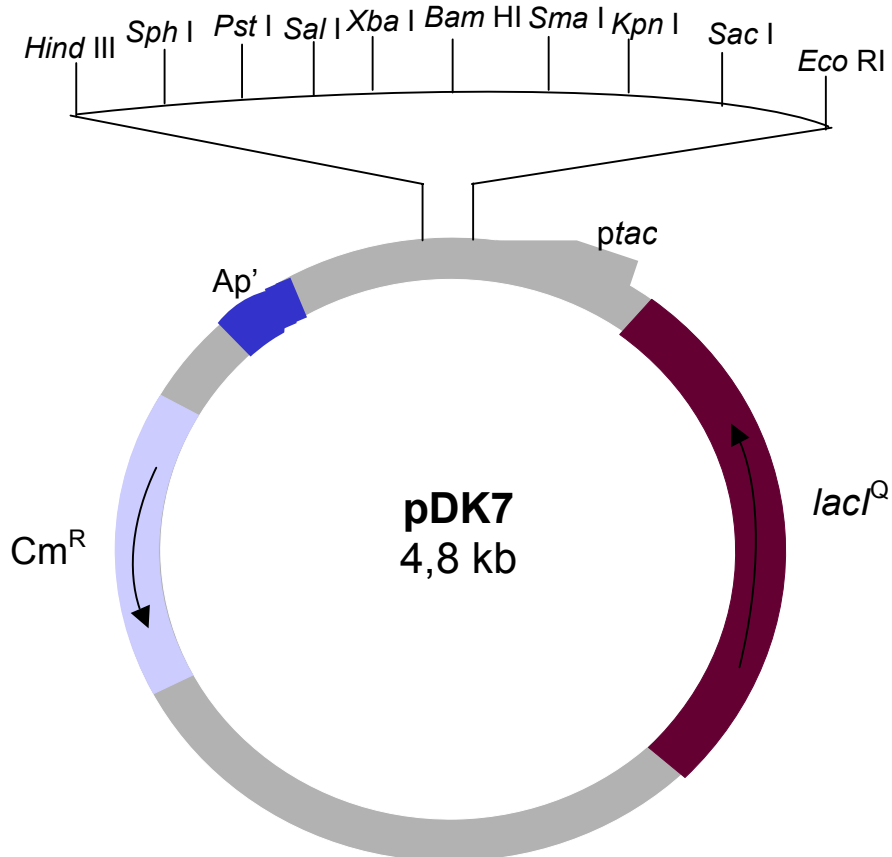
ZHANG, Y.; GRUNWALD, S. K.; LIES, D.; HALBLEID, C.; MA, Y.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by reversible ADP-ribosylation: how are the regulatory enzymes DRAT and DRAG regulated? In: TIKHONOVICH, I. A.; PROVOROV, N. A.; ROMANOV, V. I.; NEWTON, W. E. (Eds.) **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 177-182.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E.L.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P.; Functional characterization of three *GlnB* homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 6159-6168, 2001.

ZHULIN, I. B.; ARMITAGE, J. P. Motility, chemokinesis, and methylation-independent in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 952-958, 1993.

ZUMFT, W. G., F. CASTILLO. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. **Arch. Microbiol.** v. 117, p. 53–60, 1978.

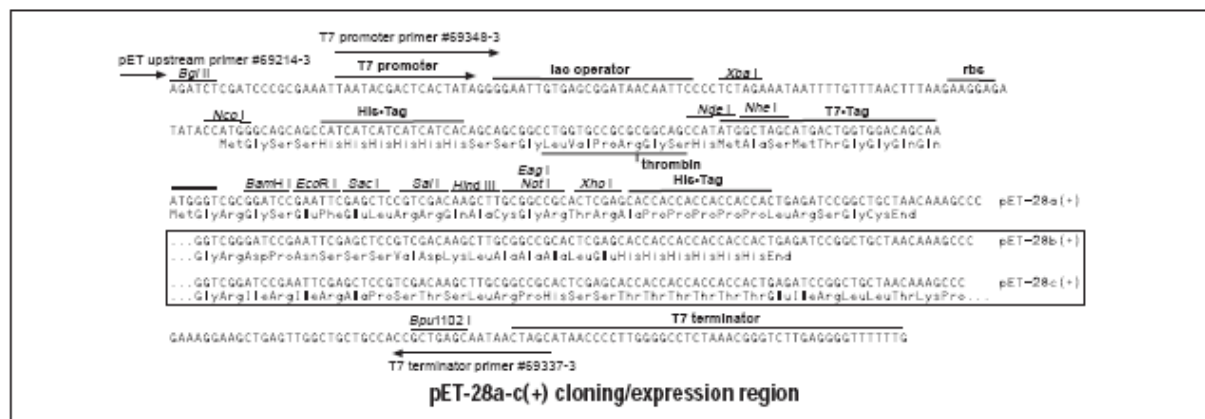
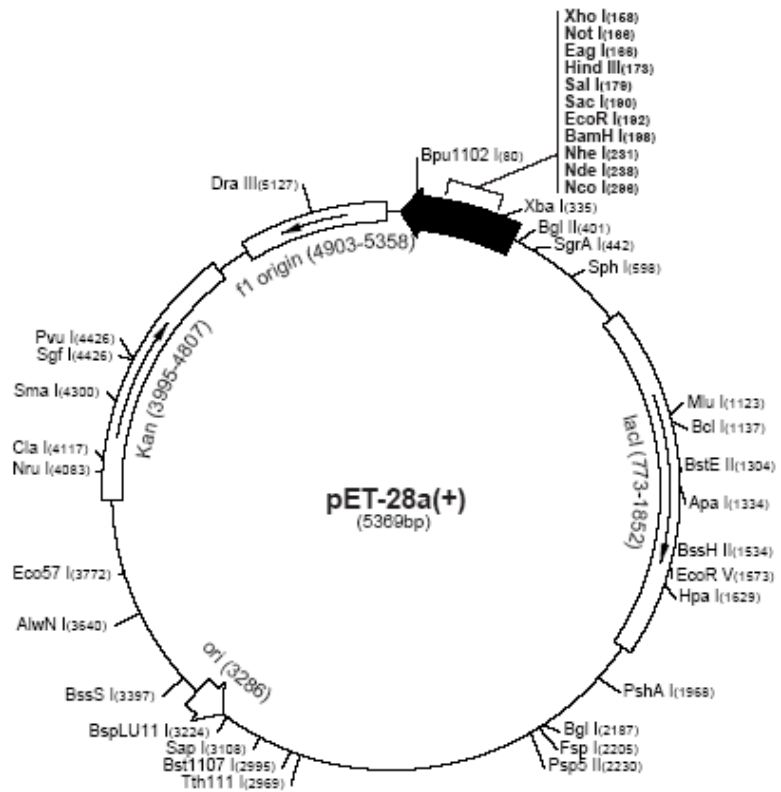
APÊNDICE 1



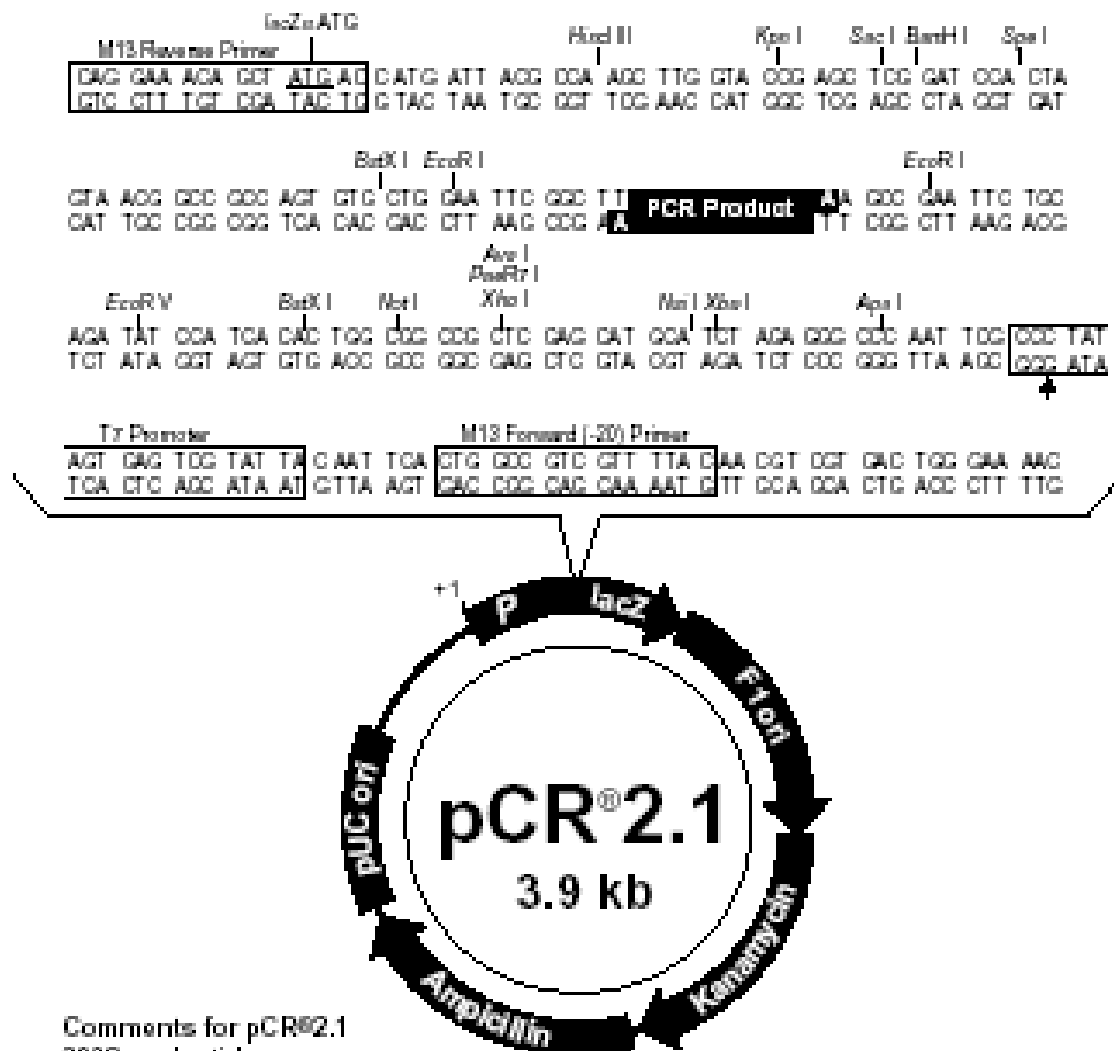
APÊNDICE 1 - Vetor de expressão pDK7 (KLEINER et al., 1988).

pET-28a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



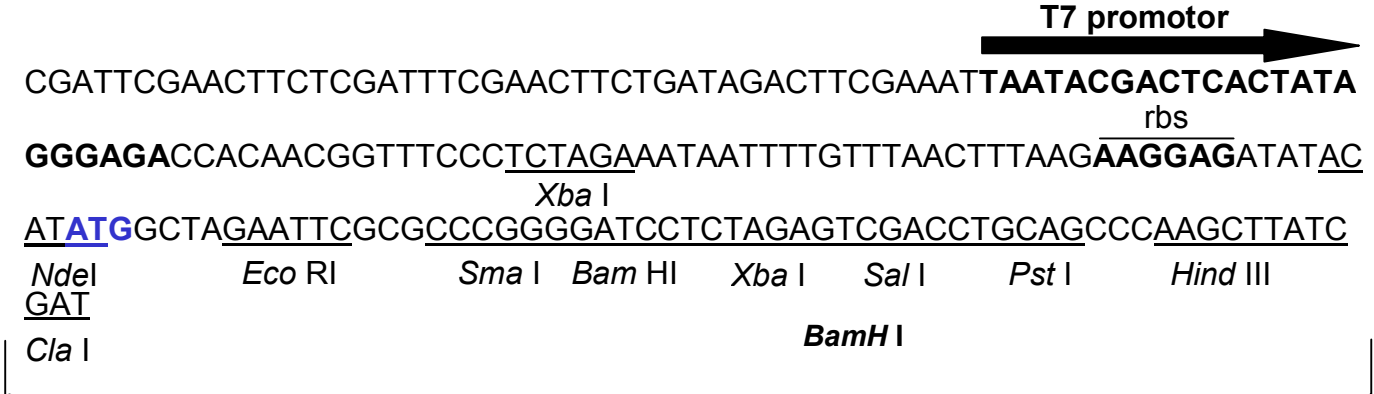
APÊNDICE 2 – Vektor pET28a.



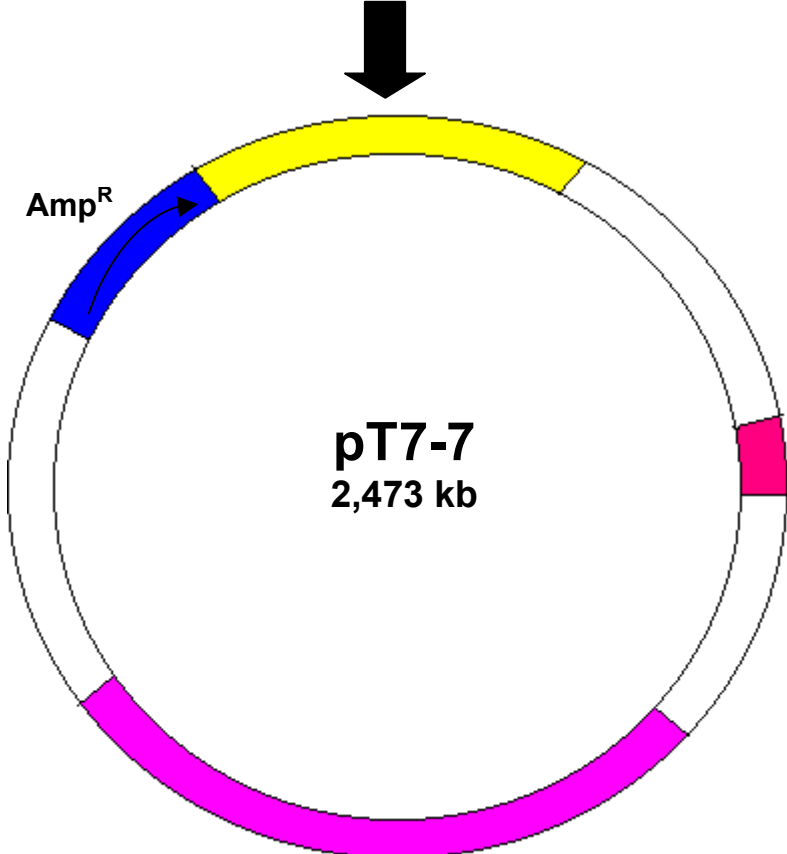
Comments for pCR[®]2.1
3929 nucleotides

- LacZa gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2969
- pUC origin: bases 3134-3807

APÊNDICE 3 – Vektor pCR 2.1.



Sítio de Policlonação



Origem de transcrição

APÊNDICE – Vetor pT7-7.

