

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA HARUMI OSAKI

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA NtrX DE
*Herbaspirillum seropedicae***

CURITIBA
2009

JULIANA HARUMI OSAKI

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA NtrX DE
*Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências–Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Liu Un Rigo

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Rose Adele Monteiro

CURITIBA
2009

AGRADECIMENTOS

As minhas orientadoras professoras Dr^a. Liu Un Rigo e Dr^a. Rose Adele Monteiro pela orientação, paciência e principalmente pela confiança que depositaram em mim desde minha iniciação científica.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de fazer parte do Núcleo de Fixação de Nitrogênio.

Aos demais professores Dr. Emanuel Maltempi de Souza, Dr^a. Leda Satie Chubatsu, Dr. Leonardo Magalhães Cruz, Dr^a. Maria Berenice Reynaud Steffens e Dr. Wanderson Duarte da Rocha. Em especial ao professor Dr. Luciano Fernandes Huergo pela grande ajuda com os experimentos em MALDI-TOF.

À Dona Julieta, Dona Roseli Prado e Valter por sempre estarem dispostos em ajudar, pelo carinho e pela amizade.

Aos amigos do laboratório 279 e 275 Giovana, (os Marco, Marco, Marco) Marco Aurélio e Marco Antonio, Gustavo, Juliana, Michelle Torres, Ana, Vânia pelas inúmeras sugestões, pelos momentos de descontração e pela amizade.

À Patrícia pelas conversas durante o caminho do RU.

Aos colegas do anexo, lab. 271 e 272, Michelle Tadra, Marcelo Müller, Viviane, Helisson, Eduardo, Stefânia, Giovani, Kerlly, Luiza, Thalita, Ana Carolina, Marcelo B., Carol.

Aos meus colegas do mestrado Anelis, Arquimedes, Carol, Dirce, Vivian, Larry, Leandro, Michelle, Paulo, Ricardo, Tati, Tuca e ao colega Arnaldo pelo companheirismo.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À minha família por sempre acreditarem em mim e pelo apoio incondicional.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica, endofítica, pertencente a classe das β -proteobactérias que se associa com gramíneas de interesse econômico como arroz, sorgo e cana-de-açúcar. As proteínas NtrYX são membros do sistema regulatório de dois componentes onde NtrY é a proteína sensora e NtrX é uma proteína reguladora de resposta. A proteína NtrX de *H. seropedicae* é composta por apenas dois domínios, o receptor de sinal e o de ligação ao DNA (HTH), diferentemente do que ocorre em organismos pertencentes a classe α -proteobactéria como por exemplo *Azorhizobium caulinodans* e *Azospirillum brasilense* nos quais NtrX possui três domínios: o receptor de sinal, AAA+ (envolvido com a hidrólise de ATP, formação do complexo aberto, interação com o fator sigma 54 da RNA polimerase e oligomerização) e HTH. Em estudos anteriores ALVES (2006) constatou que em mutantes NtrY de *H. seropedicae* há uma diminuição na expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrato e nitrito, lançando a hipótese do envolvimento das proteínas NtrYX na regulação da expressão desses genes. Para um melhor entendimento do papel do sistema NtrYX em *H. seropedicae*, foram realizados ensaios *in vitro* de atividade da proteína NtrX. A proteína recombinante ^{His}-NtrX foi superexpressa e purificada por cromatografia de afinidade com 94% de pureza e na concentração de 3,24 mg/mL. Essa proteína purificada foi utilizada nos ensaios de interação com as regiões promotoras dos operons *narXL*, *narKnirBDCnasA*, *narK1KGHJI* de *H. seropedicae* e em experimentos de retardamento de banda em gel. A proteína ^{His}-NtrX foi capaz de se ligar de forma específica às regiões promotoras e a fosforilação da proteína provavelmente aumenta a sua afinidade pelo DNA. Este resultado confirma o envolvimento da proteína NtrX na regulação da expressão dos operons *narXL*, *narKnirBDCnasA* e *narK1KGHJI* e assim consequentemente no metabolismo de nitrato e nitrito em *H. seropedicae*.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, proteína NtrX, ensaios de retardamento de banda em gel.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic, endophytic, β -proteobacterium that associates with grasses of economic interest such as sorghum, rice and sugarcane. The NtrYX proteins are members of a two-component regulatory system, NtrY is a sensor protein and NtrX is a response regulator protein. The NtrX protein of *H. seropedicae* contains only two domains, the signal receiver domain and the DNA binding domain (HTH), unlike what occurs in organisms belong to the group α -proteobacterium such as *Azorhizobium caulinodans* and *Azospirillum brasilense* that have three domains: the signal receiver, AAA+ (involved in the hydrolysis of ATP, open complex formation, sigma 54 interaction and oligomerization) and HTH. In previous studies ALVES (2006) has reported the construction of NtrY mutant of *H. seropedicae* and has showed that this mutation affected the expression of genes involved in the metabolism of nitrate and nitrite, suggesting the involvement of NtrYX in the regulation of the expression of these genes. In order to contribute to a better understanding of the role of NtrYX system in *H. seropedicae*, the NtrX protein was assayed in vitro for DNA-binding activities. The recombinant protein ^{His}-NtrX was overexpressed and purified by affinity chromatography. The purified protein was used in interaction assays to the promoter regions of operons *narXL*, *narKnirBDCnasA*, *narK1KGHJI* and using electrophoretic mobility shift assays. The band-shift assays showed that the ^{His}-NtrX protein bound specifically to these promoter regions and the protein phosphorylation probably increases their affinity for DNA. This result confirms the involvement of NtrX protein in the regulation of the operons *narXL*, *narKnirBDCnasA*, and *narK1KGHJI* expression.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae*, NtrX protein, electrophoretic mobility shift assays.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Amp	- Ampicilina
[γ 32P] ATP	- [γ ³² P] 5'trifosfato de 2'desoxiadenina
BSA	- Albumina de soro bovino
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxiribonucleotideo trifosfato
D.O.	- Densidade óptica
EDTA	- Ácido etilanolamino tetra-acético
HEPES	- Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
IPTG	- Isopropil β -D-tiogalactosideo
kDa	- Quilodalton
Km	- Canamicina
pb	- Pares de base
PEG	- Polietileno glicol
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
RBS	- Sítio de ligação ao ribossomo
rpm	- Rotações por minuto
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
Sm	- Estreptomicina
TEMED	- N',N',N',N',tetrametil-etilenodiamina
Tris	- Tris (hidroximetil)- aminometano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE FAZEM PARTE DA VIA RESPIRATÓRIA DE NITRATO.....	14
Figura 2- ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE FAZEM PARTE DA NITRATO REDUTASE PERIPLASMÁTICA.....	17
Figura 3- ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE FAZEM PARTE DA VIA DA NITRATO REDUTASE ASSIMILATÓRIA.....	20
Figura 4-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO MODULAR DO SISTEMA REGULADOR DE DOIS COMPONENTES.....	22
Figura 5-MODELO DA REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO OPERON <i>puf</i> PELA PROTEÍNA NtrX EM <i>Rhodobacter capsulatus</i>	25
Figura 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO OPERON <i>ntrYX</i> DE <i>H.seropedicae</i>	26
Figura 7- ANÁLISE DO DOMÍNIO REGULADOR DE RESPOSTA DA PROTEÍNA NtrX DE <i>H. seropedice</i>	43
Figura 8- DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA DA PROTEÍNA NtrX DE <i>H. seropedicae</i>	43
Figura 9- ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PROTEÍNAS NtrX DE DIFERENTES ORGANISMOS DA CLASSE β -PROTEOBACTÉRIA COM MAIOR IDENTIDADE.....	45
Figura 10- ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NtrX DE <i>H. seropedicae</i> COM A SEQUÊNCIA DE NtrX DE ORGANISMOS PERTENCENTES A CLASSE α -PROTEOBACTÉRIA.....	46
Figura 11- PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX DE <i>H. seropedicae</i>	49
Figura 12- ENSAIO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA (DIMERIZAÇÃO) DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX de <i>H. seropedicae</i>	51
Figura 13- ESPECTRO DE MASSAS DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA DE ^{His} -NtrX DE <i>H. seropedicae</i>	52
Figura 14- REGIÃO PROMOTORA DOS GENES <i>narX</i> , <i>narK1</i> e <i>narK</i> DE <i>H. seropedicae</i>	54
Figura 15- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>narX</i> DE <i>H. seropedicae</i>	57
Figura 16- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>narX</i> DE <i>H. seropedicae</i> NA PRESENÇA DE DNA DE TIMO BOVINO.....	58
Figura 17- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DE <i>narX</i> , NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA HOMÓLOGO NÃO MARCADO.....	59
Figura 18- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX FOSFORILADA COM CARBAMOIL FOSFATO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>narX</i>	60
Figura 19- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>narK1</i>	62
Figura 20- ENSAIO DE LIGAÇÃO DE ^{His} -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DE <i>narK1</i> NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA HOMÓLOGO NÃO MARCADO.....	63

Figura 21- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX FOSFORILADA COM CARBAMOIL FOSFATO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>narK1</i>	64
Figura 22- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>narK</i>	65
Figura 23- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>narK</i> DE <i>H. seropedicae</i> , NA PRESENÇA DE DNA DE TIMO BOVINO	66
Figura 24- ENSAIO DE LIGAÇÃO DE ^{His} -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DE <i>narK</i> , NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA HOMÓLOGO NÃO MARCADO	67
Figura 25- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His} -NtrX FOSFORILADA COM CARBAMOIL FOSFATO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>narK</i>	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	10
1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	11
1.3 METABOLISMO DE NITRATO	12
1.3.1 Nitrato redutase respiratória	13
1.3.2 Nitrato redutase periplasmática	16
1.3.3 Nitrato redutase assimilatória	18
1.4 SISTEMA REGULADOR DE DOIS COMPONENTES	20
1.5 PROTEÍNAS NtrY E NtrX	23
2 OBJETIVO	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	30
3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	31
3.3 ANTIBIÓTICOS	33
3.4 MANIPULAÇÃO DE DNA	33
3.4.1 Mini-preparação de plasmídeos	33
3.4.2 Extração e purificação de DNA genômico de <i>H. seropedicae</i>	34
3.4.3 Eletroforese em gel de ágar	34
3.4.4 Preparo de células eletrocompetentes e transformação por eletroporação	35
3.4.5 Marcação radioativa dos oligonucleotídeos iniciadores	36
3.4.6 Amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores marcados radioativamente	36
3.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE)	37
3.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-NtrX	38
3.7 ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL	39
3.8 FOSFORILAÇÃO <i>in vitro</i> DA PROTEÍNA His-NtrX	39
3.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	40
3.10 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA EM MALDI-TOF	40
4 RESULTADOS	42
4.1 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NtrX DE <i>H. seropedicae</i>	42
4.2 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-NtrX DE <i>H. seropedicae</i>	47
4.3 ENSAIO <i>in vitro</i> DE LIGAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA His-NtrX E AS REGIÕES PROMOTORAS DOS OPERONS <i>narXL</i> , <i>narKnirBDCnasA</i> E <i>narK1</i> DE <i>H. seropedicae</i>	53
4.3.1 Ensaios <i>in vitro</i> de ligação entre a região promotora do operon <i>narXL</i> e a proteína His-NtrX de <i>H. seropedicae</i>	56
4.3.2 Ensaios <i>in vitro</i> de ligação entre a região promotora do gene <i>narK1</i> e a proteína His-NtrX de <i>H. seropedicae</i>	61
4.4.3 Ensaios <i>in vitro</i> de ligação entre a região promotora do gene <i>narK</i> e a proteína His-NtrX de <i>H. seropedicae</i>	65
5 DISCUSSÃO	69

6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica (capaz de fixar nitrogênio atmosférico), endofítica obrigatória e gram-negativa. As células podem possuir de um a três flagelos em um ou em ambos os pólos. O comprimento varia de 1,5 a 5 μm conforme o meio de cultivo utilizado, possui diâmetro entre 0,6 a 0,7 μm , apresenta a capacidade de oxidar diversas fontes de carbono e fixar nitrogênio atmosférico em condições microaeróbicas (BALDANI et al., 1986).

A bactéria *H. seropedicae* pertence a classe β das Proteobactérias e se associa não patogenicamente com diversas gramíneas como arroz, sorgo, milho, trigo e cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1986), também foi isolada de plantas como bananeira e abacaxizeiro (CRUZ et al., 2001).

Foi inicialmente descrita como uma espécie do gênero *Azospirillum*, porém *H. seropedicae* possui tamanho menor e apresenta tolerância a uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0). A atividade de nitrogenase é mais tolerante a altos níveis de $p\text{O}_2$ e possui conteúdo de G+C inferior em comparação com as bactérias do gênero *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986).

H. seropedicae pode atuar como um potencial biofertilizante disponibilizando amônia para planta, já que tem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico a amônia e associar-se a plantas de grande interesse econômico, dispensando a utilização de adubos nitrogenados resultando em economia para os produtores e também benefícios para o meio ambiente (PEDROSA, 2005). Além disso, a bactéria possui a capacidade de produzir fitohormônios, que são compostos que promovem o crescimento vegetal (BASTIÁN et al., 1998).

1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos principais componentes das biomoléculas, fazendo parte da estrutura de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas, que o torna essencial à sobrevivência e crescimento das plantas, microrganismos e animais.

Embora constitua aproximadamente 78% da atmosfera terrestre, o nitrogênio gasoso (N_2) é quimicamente inerte a temperatura ambiente e diferentemente de outros elementos que ocorrem na natureza, suas reservas minerais são raras levando a necessidade de transformar o nitrogênio atmosférico em amônia e/ou nitrato, que são formas assimiláveis de nitrogênio pela maioria dos organismos.

A redução de nitrogênio atmosférico (fixação de nitrogênio) é um processo importante para a manutenção do ciclo do nitrogênio, pois devolve para o solo o nitrogênio perdido durante processo de denitrificação, o qual libera o nitrogênio fixado para a atmosfera (POSTGATE, 1998).

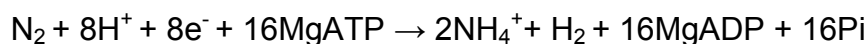
A reação de redução de nitrogênio atmosférico à amônia requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Na indústria, por exemplo, o processo de fixação do nitrogênio desenvolvido por Haber-Bosch emprega altas temperaturas (entre 300°C e 500°C) e pressões acima de 300 atm, sendo utilizados catalisadores a base de ferro que combinam o nitrogênio e hidrogênio para formar compostos químicos nitrogenados que constituem fertilizantes e até explosivos (KIM e REES, 1994).

No entanto, alguns procariotos chamados de diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, possuem a habilidade de reduzir nitrogênio atmosférico (N_2) à amônia (NH_4^+) e esse processo é chamado de fixação biológica do nitrogênio (FBN) sendo catalisado pelo complexo enzimático da nitrogenase. A amônia resultante da FBN é disponibilizada para as plantas, muitas vezes por meio de associações entre a bactéria fixadora e a planta (BURRIS, 1991).

O complexo da nitrogenase é formado pela proteína Ferro e pela proteína FeMo. A sequência de transferência de elétrons através da nitrogenase é iniciada pela redução da proteína ferro pela ferredoxina ou flavodoxina. Os elétrons então são transferidos para a proteína MoFe e esta

transferência é dependente da hidrólise de MgATP. Somente um elétron é transferido para cada 2MgATP hidrolisados e um elétron não é capaz de reduzir N₂, desta forma o ciclo tem que se repetir para que a proteína MoFe tenha acumulado elétrons suficientes para reduzir N₂ (BURRIS, 1991).

A estequiometria da reação catalisada pela nitrogenase é representada a seguir (BURRIS, 1991):



O uso desenfreado de fertilizantes químicos nitrogenados utilizados nas lavouras resulta em grandes níveis de poluição ambiental (eutrofização de rios, lagos e da água potável), desta maneira o processo de FBN surge como alternativa ao uso desses fertilizantes químicos, como uma forma renovável e não poluente de disponibilização de nitrogênio para agricultura (ZAHARAN, 1999).

1.3 METABOLISMO DE NITRATO

O nitrato faz parte do ciclo biológico do nitrogênio, é um composto inorgânico que em excesso, contamina o lençol freático de rios e lagos. Em humanos o nitrato é convertido em compostos carcinogênicos pelas bactérias do trato digestivo e pode causar também o aparecimento de metahemoglobinemia em crianças. Entretanto o nitrato também possui potencial terapêutico em condições como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial sistêmica e pulmonar, e ulceração gástrica (MORENO-VIVIÁN et al, 1999; revisado por LUNDBERG, WEITZBERG E GLADWIN, 2008).

As bactérias, algas, fungos e plantas são capazes de utilizar o nitrato como fonte alternativa de nitrogênio. Desta maneira o processo de redução do nitrato, que é de grande importância biológica, tem se tornado foco de diversos estudos (MORENO-VIVIÁN et al, 1999).

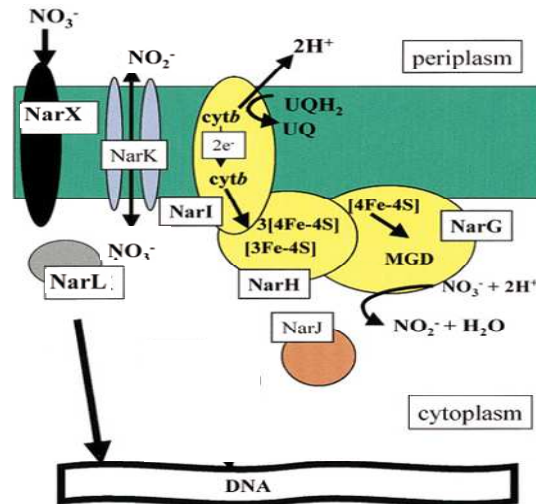
O nitrato presente no meio pode ser metabolizado pelas bactérias através de três vias: respiratória, assimilatória e dissimilatória. Na via

respiratória, o nitrato é utilizado pelas bactérias como sendo o aceptor final de elétrons em condições limitantes de oxigênio. Na via assimilatória, como fonte alternativa de nitrogênio onde o nitrato é reduzido a amônio visando propósitos biossintéticos e na via dissimilatória na qual o nitrato pode atuar no balanço redox, devido a sua capacidade redutora (COLE, 1996; MORENO-VIVIÁN et al, 1999).

1.3.1 Nitrato redutase respiratória

Na via respiratória o nitrato é reduzido a nitrito através do complexo enzimático da nitrato redutase respiratória, também conhecida como NAR. O complexo enzimático NAR está ancorado na membrana plasmática e o sítio catalítico está voltado para o citoplasma. NAR é composto por três subunidades α , β e γ , essas proteínas são codificadas pelo operon *narGHJI*. A subunidade α é formada pela proteína NarG e a β pela proteína NarH, estas proteínas estão localizadas no lado interno da membrana voltado para o citoplasma. A subunidade γ é formada por NarI que é uma proteína transmembrana e faz a ancoragem de todo o complexo na membrana. A proteína NarJ é necessária para que ocorra a montagem de todo complexo (Figura 1) (MacGREGOR, SCHNAITMAN e NORMANSELL, 1974; SODERGREN, HSU, DeMOSS, 1988).

Figura 1- ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE FAZEM PARTE DA VIA RESPIRATÓRIA DE NITRATO



FONTE: RICHARDSON et al., 2001

Organização das proteínas que compõem a via assimilatória de nitrato, codificadas por genes presentes em *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *M. tuberculosis*. Em amarelo as proteínas que compõem o complexo NAS; em azul proteína transportadora NarK; em preto proteína sensora NarX e em cinza proteína reguladora de resposta NarL.

Além do operon *narGHJI* outros genes conhecidos como genes *nar*, fazem parte desta via respiratória como o *narK* e *narXL* os quais codificam para proteínas com os respectivos nomes NarK e NarXL (Figura 1).

O transporte de nitrato e nitrito é realizado pela proteína transmembrana NarK. Essa proteína transportadora pertence a superfamília dos facilitadores principais (MFS), na qual o transporte é dependente do gradiente iônico não necessitando da hidrólise de ATP. Dentro da família MFS as proteínas NarK são divididas em duas subfamílias: tipo 1 e tipo 2. Na subfamília NarK tipo 1 estão as transportadoras nitrato/próton simporte, enquanto nas tipo 2 estão as nitrato/nitrito antiporte (MARGER e SAIER, 1993; MOIR e WOOD, 2001).

A proteína NarK foi identificada primeiramente em *E. coli* e está localizada a montante dos genes estruturais do complexo enzimático da nitrato redutase, os genes *narGHJI*, com os quais formam um operon. Estudos demonstraram que em mutante *narK*, a taxa de transporte de nitrato não foi

significativa em comparação com a estirpe selvagem em *E. coli*, indicando o envolvimento da proteína NarK no transporte de nitrato em *E. coli* (NOJI et al, 1989).

Em *Pseudomonas aeruginosa* existem duas proteínas transportadoras do tipo NarK que são classificadas como NarK1 e NarK2, os genes que codificam essas proteínas estão localizados a montante dos genes *narGHJI*, formando um operon. Em ensaios de complementação, os mutantes *nark2* e o duplo mutante *nark1K2*, foram complementados pela proteína NarK de *E. coli* indicando que funcionalmente as proteínas NarK2 de *P. aeruginosa* e NarK de *E. coli* são similares (SHARMA, NORIEGA e ROWE, 2006).

A bactéria causadora da tuberculose *Mycobacterium tuberculosis*, também possui genes que codificam para possíveis proteínas transportadoras de nitrato e nitrito são elas: NarK1, NarK2 e NarK3. Dessas proteínas apenas a NarK2 foi analisada, e observou-se que a proteína está envolvida no transporte de nitrato e nitrito, uma vez que foi capaz de complementar o mutante *nark* em *E. coli* (SOHASKEY e WAYNE, 2003).

Os genes *narXL* fazem parte do sistema regulatório de dois componentes, no qual a proteína NarX é uma proteína sensora e NarL é uma proteína reguladora de resposta que é capaz de se ligar ao DNA. As proteínas NarXL respondem a presença de nitrato e são responsáveis pelo controle dos genes da via respiratória anaeróbica em *E. coli* inclusive da nitrato redutase (*narGHJI*) e do transportador NarK (STEWART, PARALES e MERKEL, 1989).

A proteína transmembrana NarX detecta a presença de nitrato e nitrito no periplasma e transmite essa informação por meio de fosforilação para o regulador de resposta NarL, que por sua vez vai desencadear a resposta ativando ou reprimindo a transcrição de genes da via anaeróbica. NarX em presença de nitrito, atua como regulador negativo de NarL fosforilado (STEWART, PARALES e MERKEL, 1989; SCHRÖDER et al., 1994).

H. seropedicae possui em seu genoma os genes *nar* que codificam para as proteínas que fazem parte da via da nitrato redutase respiratória. Os genes que codificam as proteínas transportadoras de nitrato e/ ou nitrito, NarK1 e NarK, estão a montante dos genes estruturais da enzima NarGHJI. O terceiro gene *nark* está a montante dos genes que codificam para uma provável enzima nitrito redutase (*nirBDC*). *H. seropedicae* também possui os genes

narXL, cujos produtos são responsáveis pela regulação dos genes do metabolismo de nitrato (ALVES, 2006).

1.3.2 Nitrato redutase periplasmática

A via dissimilatória é formada pelo complexo enzimático da nitrato redutase periplasmática (NAP), foi identificado inicialmente na bactéria fotossintética *Rhodobacter sphaeroides* e está localizado na região periplasmática. O operon *nap* contém quatro genes em comum, *napDABC* (MORENO-VIVIÁN et al., 1999).

A nitrato redutase periplasmática é encontrada em uma grande variedade de bactérias isoladas dos mais diversos ambientes, desempenhando diferentes papéis fisiológicos e sendo expressa sob diferentes condições (PHILIPPOT E HØJBERG, 1999; GAVIRA et al., 2002). Em *E. coli* o operon *napFDAGHBC* é regulado por Fnr e por nitrato. A máxima expressão do operon ocorre em baixa concentração de nitrato e sob condições anaeróbicas. A proteína NarP ativa a expressão do operon *napF* e a proteína NarL possui um efeito negativo na expressão (STEWART et al., 2002). Em *R. sphaeroides* a expressão do operon *napKEFDABC* é ativada sob condições aeróbicas, o nitrato atua como um ativador direto do complexo enzimático da NAP e não está envolvido na regulação dos genes *nap* (GAVIRA et al., 2002).

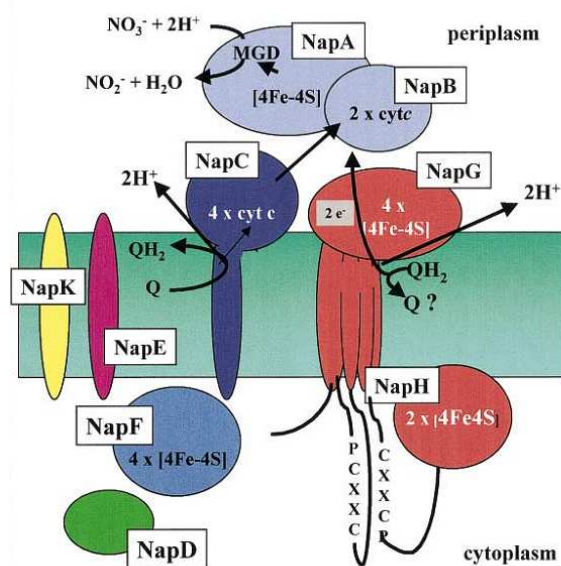
O complexo da NAP, presente em bactérias, é composto por apenas duas subunidades NapA e NapB. A proteína NapA forma a subunidade catalítica que contém o cofator bis-molibdopterina guanina dinucleotídeo (bis-MGD) e um cluster [4Fe-4S]. A proteína NapB é um citocromo c que recebe elétrons da proteína NapC ligada a membrana (SALOH, 1981; MORENO-VIVIÁN et al., 1999).

A proteína NapD é citoplasmática e provavelmente está envolvida com o processamento de NapA antes de ser exportada para o periplasma (REYES et al., 1998). Há outros genes *nap* que são encontrados em diferentes organizações nos organismos. As proteínas NapE e NapK são transmembrana, com provável função de mediar interações entre NapC e a quinol oxidase. NapF é citoplasmática e possui 4 cisteínas que ligam ao centro [4Fe-4S], NapG

liga ao centro [4Fe-4S] e está voltada para o periplasma, NapH é uma proteína integral de membrana provável quinol desidrogenase (Figura 2) (REYES et al., 1998).

A bactéria *H. seropedicae* não possui os genes que codificam as proteínas pertencentes a via dissimilatória de nitrato.

Figura 2- ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE FAZEM PARTE DA NITRATO REDUTASE PERIPLASMÁTICA



FONTE: RICHARDSON et al., 2001

Organização das proteínas que compõem a via dissimilatória de nitrato, codificadas por genes presentes em *Paracoccus denitrificans*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhizobium sp.G179* e *Shewanella putrefaciens*.

1.3.3 Nitrato redutase assimilatória

A nitrato redutase assimilatória (NAS) faz parte da via assimilatória de nitrogênio. NAS é um complexo enzimático citoplasmático que catalisa duas reduções, a do nitrato a nitrito e do nitrito a amônio que será incorporado ao metabolismo do organismo. NAS é dividida em duas classes de acordo com o doador de elétrons: a flavodoxina ou ferredoxina-dependente (enzimas monoméricas) e NADH-dependente (enzimas heterodiméricas). Ambas as classes possuem cofator bis-MGD e cluster ferro-enxofre (MORENO-VIVIÁN et al, 1999; RICHARDSON et al., 2001).

Em *Klebsiella oxytoca* os produtos dos genes *nasFEDCBA* fazem o transporte, a redução de nitrato e de nitrito. Os genes *nasFED* codificam um sistema de proteínas transportadoras de nitrato e nitrito, os genes *nasCA* formam duas subunidades do complexo enzimático da NAS, da classe NADH-dependente e *nasB* a nitrito redutase assimilatória (Figura 3) (LIN et al., 1994).

A subunidade catalítica da NAS de *K. oxytoca* é formada pela proteína NasA, que possui cluster Fe-S e cofator molibdopterina, a segunda subunidade do complexo é formada pela NasC, que liga ao cofator FAD e faz a transferência de elétrons do NAD(P)H para NasA (LIN et al., 1994).

Os produtos dos genes *nasFED* de *K. oxytoca* formam um típico transportador do tipo ABC (ATP-dependente), composto pela proteína periplasmática NasF, proteína integral de membrana NasE e pela proteína NasD que é uma ATPase e esta voltada para o citoplasma (LIN et al., 1994).

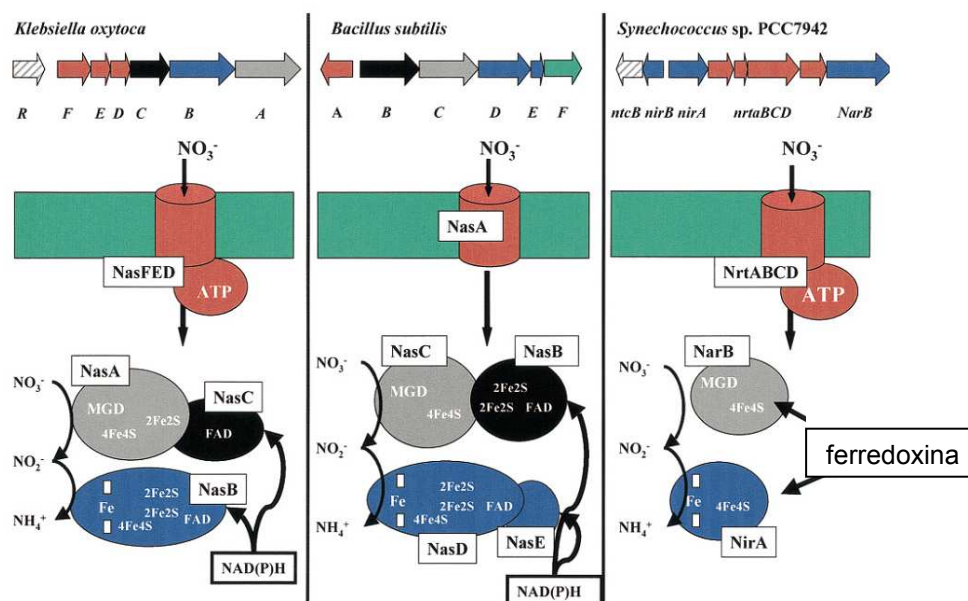
A bactéria *H. seropedicae* também possui os genes *nasFED* que codificam para um típico transportador de nitrato do tipo ABC, dependente de ATP e o gene *nasA* que codifica para enzima NADH-nitrato redutase assimilatória (ALVES,2006). O gene *nasA* de *H. seropedicae* está localizado a jusante dos genes estruturais da nitrito redutase (*nirBDC*), formando o operon *narKnirBDCnasA* (GENOPAR).

Em *Synechococcus* sp., o complexo enzimático da nitrato redutase assimilatória é mais simples do que em *K. oxytoca* e pertence a classe das ferredoxina-dependentes. Os genes que codificam para NAS estão organizados em um operon *nirAnrtABCDnarB*. Os produtos dos genes *nrtABCD* formam um transportador de nitrato ATP-dependente (tipo ABC), a proteína

NarB forma a enzima nitrato redutase assimilatória e NirA forma a nitrito redutase. A nitrato redutase de *Synechococcus* sp. é um polipeptídeo que contém cofator molibdopiterina e centro ferro-enxofre, a ferredoxina é o doador de elétrons os quais são gerados pelo fotossistema I (Figura 3) (RUBIO, HERRERO E FLORES, 1996).

Em *Bacillus subtilis* os genes *nasBC* codificam para NADH-nitrato redutase: NasB é uma flavoproteína doadora de elétrons e NasC é a subunidade catalítica, *nasDE* codificam para NADH-nitrito redutase: o produto de *nasD* forma a subunidade catalítica e *nasE* codifica a região C-terminal da nitrito redutase, pois aparentemente é transcrita separadamente. A proteína transportadora de nitrato (NasA) é homóloga a NarK, sendo o transporte independente de ATP (Figura 3) (OGAWA et al., 1995). Como *B. subtilis* possui apenas uma nitrito redutase e duas nitrato redutase, a assimilatória (NasBC) e a respiratória (NarGHI), as enzimas Nar podem atuar juntas com a NADH-nitrito redutase durante o crescimento anaeróbico (NAKANO et al., 1998).

Figura 3 - ORGANIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DA NITRATO REDUTASE ASSIMILATÓRIA



FONTE: RICHARDSON et al., 2001

Organização das proteínas que compõem a via assimilatória de nitrato; em vermelho proteína transportadora de nitrato; cinza e preto complexo NAS; azul complexo da nitrito redutase.

1.4 SISTEMA REGULADOR DE DOIS COMPONENTES

Uma eficiente cascata de sinalização é necessária para que um organismo sobreviva frente as mais variadas condições ambientais e intracelulares. Desse modo, esses organismos desenvolveram um sistema de monitoramento que é conhecido como sistema regulador de dois componentes, que atua como um mecanismo de estímulo-resposta, o qual permite aos organismos perceber, interpretar e responder os mais diversos estímulos (STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000; FOUSSARD et al., 2001; GALPERIN, 2004).

Esse sofisticado sistema possui como característica importante, a organização modular de seus componentes, os quais integram uma ampla variedade de circuitos de sinalização celular. Muitas proteínas transdutoras de sinal são constituídas por dois ou mais domínios, que são conservados

individualmente durante a evolução, o que torna possível determinar a atividade de cada domínio isoladamente (Figura 4) (CHANG e STEWART, 1998; STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000; FOUSSARD et al., 2001; GALPERIN, 2004).

O sistema regulador de dois componentes é formado por duas grandes famílias de sinalizadores modulares, a proteína sensora (proteína quinase), contendo o domínio quinase conservado e a proteína reguladora de resposta, contendo o domínio regulatório conservado (CHANG e STEWART, 1998; WEST e STOCK, 2001).

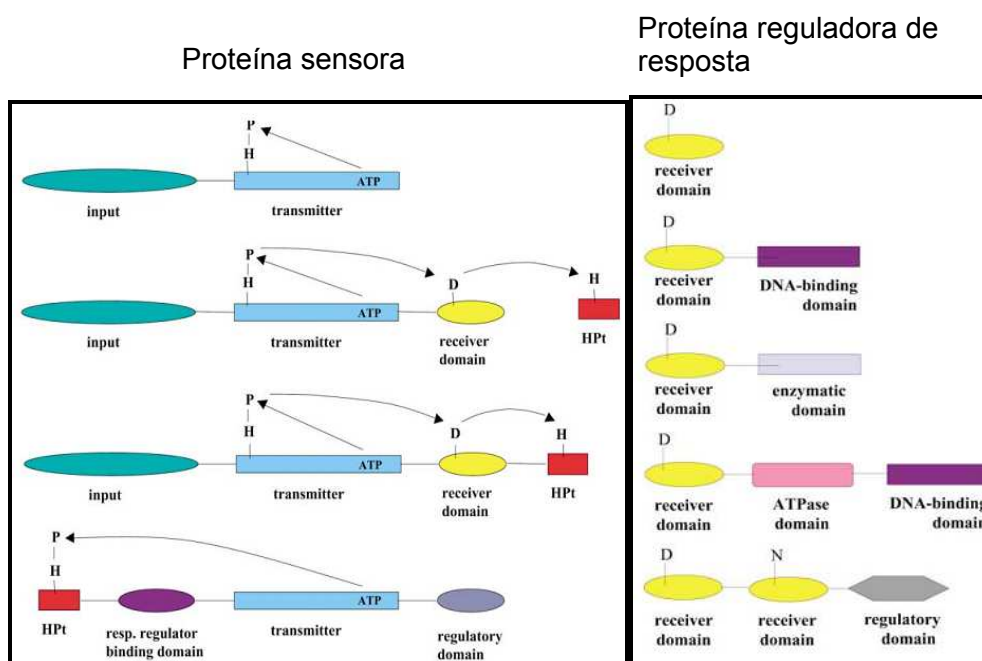
A proteína sensora também conhecida como proteína quinase, possui função quinase/fosfatase, que comunica ao seu par regulador de resposta através de fosforilação a ocorrência de alguma alteração. A proteína reguladora de resposta atuará ativando ou reprimindo a transcrição de um determinado gene ou de um grupo de genes desencadeando a resposta (STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000; WEST e STOCK, 2001).

A transferência de sinal, envolvendo uma proteína sensora histidina quinase e uma proteína reguladora de resposta, ocorre basicamente em três etapas (WEST e STOCK, 2001). Primeiramente ocorre a autofosforilação, o domínio sensor localizado na região C-terminal da proteína quinase detecta um estímulo, o qual faz com que ocorra a autofosforilação da proteína, com a transferência do grupo gama-fosfato do ATP para a cadeia lateral do resíduo de histidina da proteína sensora. A segunda etapa é a transferência do grupo fosfato, que estava ligado a histidina, para um resíduo de aspartato presente no domínio receptor localizado na região N-terminal da proteína reguladora. Essa fosforilação ativa o domínio efetor presente na região C-terminal da proteína, levando a ativação ou repressão da transcrição de genes. Por fim ocorre a defosforilação, por hidrólise o grupo fosfato é retirado do resíduo de aspartato da proteína reguladora, reestruturando a proteína para que possa participar de outras reações e finalizando a reação de resposta ao estímulo (STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000; WEST e STOCK, 2001).

A maioria dos sistemas de dois componentes possui um mecanismo básico de reação, ou seja, uma proteína quinase fosforila o seu único par regulador de resposta (His-Asp). Porém, há variações mais complexas como múltiplas proteínas quinase que fosforilam apenas uma reguladora de resposta

ou o inverso, uma proteína quinase fosforila várias reguladoras de resposta, por exemplo, as proteínas sensoras NarX e NarQ interagem com a proteína reguladora NarL em *Escherichia coli* K-12 (RABIN e STEWART, 1993; STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000;).

Figura 4-REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO MODULAR DO SISTEMA REGULADOR DE DOIS COMPONENTES



Fonte: FOUSSARD et al., 2001

Organização modular da proteína sensora e da proteína reguladora de resposta. Proteína sensora: (input) domínio sensor em alguns casos possui regiões transmembranas; (transmitter) possui a sequência conservada entre as proteínas histidinas quinases; (receiver domain) domínio receptor; (HPT) unidade de fosfotransferência. Proteína reguladora de resposta: (receiver domain) domínio receptor; a proteína reguladora de resposta pode carregar módulos com funções adicionais cuja atividade é regulada pelo domínio receptor.

1.5 PROTEÍNAS NtrY E NtrX

As proteínas NtrY e NtrX fazem parte de um sistema regulatório de dois componentes, no qual a proteína NtrY é a proteína sensora e NtrX é a reguladora de resposta. NtrY e NtrX foram identificadas e caracterizadas em *Azorhizobium caulinodans* ORS571, em *Azospirillum brasilense* e em *Rhodobacter capsulatus* (PAWLOWSKI, KLOSSE e BRUIJN, 1991; ISHIDA et al, 2002; GREGOR et al 2007).

As proteínas NtrY/X de *A. caulinodans* participam da regulação da fixação de nitrogênio e em *A. brasilense* estão envolvidas na regulação da assimilação de nitrato (PAWLOWSKI, KLOSSE e BRUIJN, 1991; ISHIDA et al, 2002).

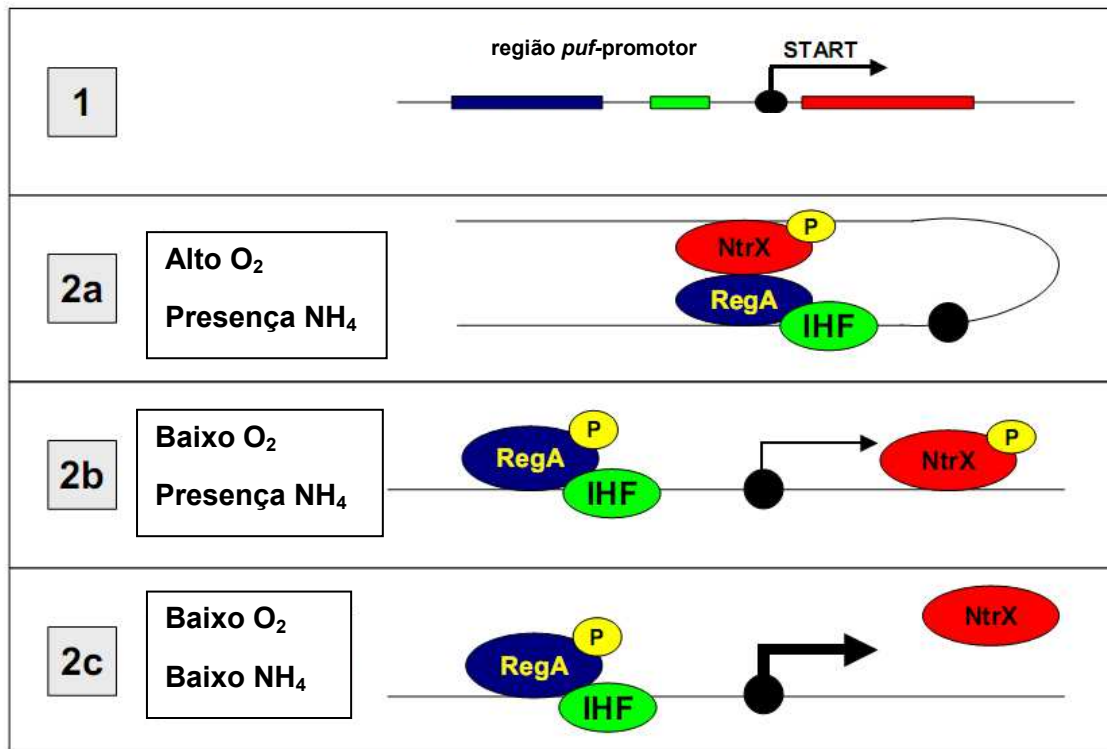
O sistema de dois componentes NtrY/X foi descrito inicialmente por Pawlowski et al. (1991) em *A. caulinodans*. Com o objetivo de avaliar o papel dos genes *ntrY/X* de *A. caulinodans* quanto a capacidade de utilização de nitrogênio, Pawlowski et al. (1991) inocularam estirpes mutantes *ntrY/X* em meio de cultura contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Essas estirpes mutantes apresentaram um crescimento muito reduzido, em relação a estirpe selvagem. A estirpe duplo mutante *ntrC/ntrY* não cresceu neste meio contendo nitrato, indicando que a expressão dos genes *ntrYX* pode ser parcialmente controlada por NtrC. A proteína NtrX está envolvida no controle da expressão do gene *nifA* em *A. caulinodans*, pois houve uma menor expressão da fusão promotor *nifA::lacZ* quando introduzida em estirpe mutante *ntrX*, indicando que há um envolvimento do produto do gene *ntrX* no controle da expressão do gene *nifA* (PAWLOWSKI, KLOSSE e BRUIJN, 1991).

Ishida et al. (2002), através de estudos de complementação, verificaram que mutantes *ntrBC* de *A. brasilense*, os quais não crescem na presença de nitrato, foram complementados pelos genes *ntrYX*, sugerindo que pode existir uma substituição entre os pares *ntrYX* e *ntrBC*, em relação ao crescimento na presença de nitrato. O produto do gene *ntrX* de *A. brasilense*, não tem efeito sob a expressão da fusão promotor *nifA::lacZ*, sugerindo que ao contrário do que ocorre em *A. caulinodans* as proteínas NtrY/X não estão envolvidas na expressão do gene *nifA* (ISHIDA et al, 2002).

Na bactéria fotossintética facultativa *R. capsulatus*, a proteína NtrX fosforilada interage com a proteína RegA, a qual é uma reguladora de resposta do sistema de dois componentes RegB/RegA, que está envolvida na regulação redox dependente dos genes que codificam proteínas envolvidas com a fotossíntese e também com outros sistemas redox-dependentes. Ensaios utilizando a estirpe mutante *ntrX* de *R. capsulatus* e ensaios *in vitro* de interação proteína-DNA, revelaram que a proteína NtrX regula negativamente a formação do complexo fotossintético através da interação com a região promotora do operon *puf*, o qual codifica para proteínas que ligam ao pigmento do complexo coletor de luz (LH) I. Este resultado foi confirmado pelo ensaio de *footprint*, onde o DNA foi protegido da digestão enzimática na região que corresponde ao sítio de início de transcrição do operon *puf* (GREGOR et al, 2007).

Sob altos níveis de oxigênio e presença de amônio, as proteínas NtrX fosforilada (NtrX~P), RegA e IHF se ligam ao DNA. Com o auxílio da proteína IHF, NtrX~P interage com RegA levando a repressão da transcrição do operon *puf*. Em baixos níveis de oxigênio e presença de amônio, a proteína RegA está fosforilada (RegA~P) e se liga ao DNA juntamente com NtrX~P e IHF, a RegA~P impede que ocorra a dobra do DNA evitando a interação de NtrX~P e RegA~P. Nesta situação a repressão da transcrição pela NtrX~P é fraca. Na presença de baixos níveis de oxigênio e amônio, NtrX defosforilada se desliga do DNA ocorrendo assim a transcrição do operon *puf* (Figura 5).

Figura 5 - MODELO DA REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO OPERON *puf* PELA PROTEÍNA NtrX EM *Rhodobacter capsulatus*



FONTE: GREGOR, 2002.

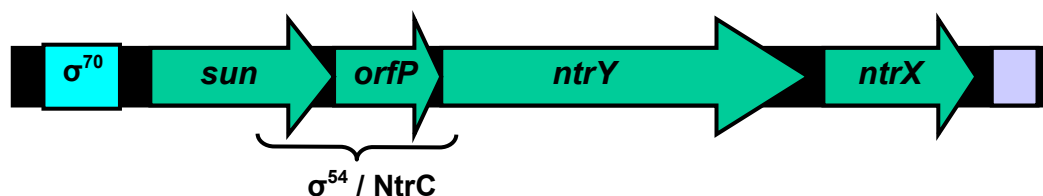
Representação esquemática da regulação da transcrição do operon *puf* pela proteína NtrX em *R. capsulatus* (GREGOR, 2002). Painel 1: região promotora do operon *puf*, em azul sítio de ligação para proteína RegA, em verde sítio de ligação para IHF e em vermelho sítio de ligação para NtrX. Início de transcrição representado pela seta START; painel 2a: interação entre a proteína NtrX~P e RegA com auxílio de IHF inibindo a transcrição; painel 2b: inibição da transcrição por RegA~P e NtrX~P sem interação entre NtrX e RegA; painel 2c: ativação da transcrição pelo desligamento da proteína NtrX.

A proteína sensora quinase NtrY de *R. capsulatus* pode ativar por fosforilação a proteína reguladora de resposta NtrC, a qual regula os genes envolvidos na fixação e assimilação de nitrogênio e também regula os genes da utilização de uréia. Uma vez que, a estirpe mutante *ntrB* cresceu na presença de uréia e N₂ como única fonte de nitrogênio e a estirpe duplo mutante *ntrB/ntrY* não foi capaz de crescer na presença destes compostos (DREPPER et al, 2006).

Em *H. seropedicae* o operon *ntrYX* foi identificado durante o projeto GENOPAR (Programa Genoma do Paraná). Análises da sequência de DNA demonstraram que os genes *ntrYX* estão localizados a jusante de duas orfs transcritas na mesma direção. A primeira codifica a proteína SUN uma possível RNA metil transferase e a segunda orf denominada *orfP* codifica um produto similar a um peptídeo rico em prolina com função desconhecida (Figura 6) (ALVES, 2004).

A montante do gene *sun* há uma provável região promotora dependente do fator σ^{70} da RNA polimerase. Análises indicaram que o gene *sun* é constitutivamente expresso e sua região promotora possivelmente influencia a expressão de *ntrYX*. Na região codificadora de *orfP* há duas prováveis regiões promotoras dependentes do fator σ^{54} da RNA polimerase e três prováveis sítios de ligação para proteína NtrC. Análises de expressão contendo esta região codificadora indicaram ser a provável região promotora dos genes *ntrYX* (Figura 6) (ALVES, 2006).

Figura 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO OPERON *ntrYX* DE *H. seropedicae*



Em azul: região promotora dependente do fator σ^{70} ; Gene *sun*: codifica para uma possível RNA metil transferase; Gene *orfP*: codifica para um peptídeo rico em prolina; Gene *ntrY*: codifica para uma proteína sensora transmembrana; Gene *ntrX*: codifica para uma proteína sensora; em azul claro: região terminadora.

A proteína sensora NtrY produto do gene *ntrY*, possui três domínios: N-terminal, central e C-terminal. O domínio N-terminal possui 4 regiões transmembrana; o domínio central possui 3 regiões: HAMP presente em várias proteínas sensoras (Histidina quinases, Adenilil ciclases, proteínas de ligação Metil, Fosfatases), PAS (região sensora) e HisKA domínio fosfoceptor (His quinase A) e o domínio C-terminal apresenta o domínio HATPaseC responsável pela fosfotransferência e com atividade ATPase (Histidina quinase-type ATPases).

A proteína reguladora NtrX produto do gene *ntrX*, possui dois domínios: N-terminal e C-terminal. O domínio N-terminal possui a região REC ou “Response Regulator” (fosfoceptor) que recebe o sinal do seu par sensor através de fosforilação do resíduo de aspartato, já o domínio C-terminal possui o motivo HTH ou hélice-volta-hélice que está relacionada com a ligação ao DNA para a regulação da transcrição (ALVES, 2004).

O gene *ntrY* em *H. seropedicae*, não está envolvido com fixação de nitrogênio, pois em ensaios de redução de acetileno a estirpe mutante *ntrY*, apresentou valores da atividade de nitrogenase similares à estirpe selvagem (ALVES, 2006).

O mutante *ntrY* de *H. seropedicae* foi analisado quanto à capacidade de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio e demonstrou ser incapaz de crescer. O fenótipo mutante foi complementado pela cópia selvagem dos genes *ntrYX*, indicando um possível envolvimento destes genes no metabolismo de nitrato (ALVES, 2006).

Uma vez que a detecção de nitrato no ambiente é feita pelo sistema de dois componentes NarXL em *E. coli*, onde NarX é a proteína sensora e NarL é a reguladora de resposta, Alves (2006) analisou a região promotora dos genes *narXL* de *H. seropedicae* através de fusão do promotor *narX::lacZ*. Na presença de nitrato houve expressão da fusão *narX::lacZ* na estirpe mutante *ntrY* de *H. seropedicae*, no entanto a expressão foi três vezes menor quando comparado a estirpe selvagem. Essa expressão da fusão no mutante *ntrY* sugere que além de NtrY, provavelmente a proteína NarL regula a expressão do seu próprio operon *narXL*, já que em outros organismos como por exemplo

E. coli a proteína NarL regula seu próprio operon (STEWAT e PARALES, 1988; DARWIN e STEWART, 1995; ALVES, 2006).

A expressão da região promotora do operon *narKnirBDCnasA* de *H. seropedicae*, o qual codifica para a proteína transportadora de nitrato NarK e para o complexo enzimático da nitrito redutase respiratória, proteínas NirBDC, também foi testada no mutante *ntrY* na presença de nitrato ou nitrito. Não houve expressão desta fusão *narK::lacZ*, indicando que o gene *ntrY* é essencial para a expressão do operon *narKnirBDCnasA*. Na estirpe selvagem houve expressão máxima da fusão na presença de nitrato, molibdênio e em microaerofilia. Ainda na estirpe selvagem a expressão de *narK::lacZ*, quando em presença de nitrito, foi 1,5 vezes menor em comparação com nitrato. Já na estirpe mutante *ntrC* a expressão da fusão *narK::lacZ*, foi duas vezes menor do que na estirpe selvagem, indicando que a proteína NtrC possa estar regulando a expressão de *ntrY/X* em *H. seropedicae* (ALVES, 2006).

A região promotora dos genes *nasFED* de *H. seropedicae*, envolvidos na via de assimilação de nitrato, foi analisada. Não houve a expressão da fusão do promotor *nasF::lacZ* na estirpe mutante *ntrY*, quando em presença de nitrato, indicando o envolvimento de *ntrY* na regulação de *nasFED* (ALVES, 2006).

As proteínas NtrY e NtrX estão presentes em vários organismos, no entanto há poucos estudos sobre as funções dessas proteínas. Desta forma, surge a necessidade de mais pesquisas, para caracterizá-las e compreender melhor o papel das proteínas NtrY/NtrX no contexto do metabolismo de nitrato e nitrito em *H. seropedicae*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcionalmente a proteína NtrX de *H. seropedicae*, através de ensaios de ligação da proteína NtrX a regiões promotoras dos genes envolvidos no metabolismo de nitrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a sequência de aminoácidos da proteína NtrX utilizando programas de bioinformática;
- Estabelecer melhores condições de superexpressão e purificação da proteína NtrX de *H. seropedicae*;
- Determinar a capacidade de ligação da proteína ^{His}-NtrX às regiões promotoras dos operons *narXL*, *narKnirBDCnasA* e *narK1K* de *H. seropedicae*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

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

Tabela 1 - Estirpes de bactérias e plasmídeos

<u>Estirpe</u>	<u>Genótipo ou Características relevantes</u>	<u>Fonte/Referência</u>
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> <i>galU</i> <i>galK</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	INVITROGEN Inc.
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	STUDIER e MOFFAT, 1983
<i>H. seropedicae</i>		
SmR1	Sm ^R , <i>nif</i> ⁻	SOUZA et al., 1995
<u>Plasmídeo</u>	<u>Genótipo ou Características relevantes</u>	<u>Fonte/Referência</u>
pET28a	Promotor T7, <i>lacI</i> , Km ^R , sequência codificadora para cauda de histidinas.	NOVAGEN Inc.
pJHO2	Fragmento <i>NdeI</i> - <i>Bam</i> HI contendo o gene <i>ntrX</i> de <i>H. seropedicae</i> em vetor pET28a.	OSAKI, 2007

3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Lúria-Bertani Broth (LB), SOB e SOC (INVITROGEN) sob agitação (120 rpm) a 37°C e para cultivo em meio sólido foi utilizado meio Luria-Bertani Agar (LA) (SAMBROOK et al., 1989).

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

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

O meio LA sólido é composto de meio LB acrescido de 15 g/L de ágar antes de autoclavar.

O meio SOB possui a seguinte composição:

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de potássio	0,186 g/L
Cloreto de sódio	0,584 g/L

O meio SOC (Invitrogen) possui a seguinte composição:

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de potássio	0,19 g/L
Cloreto de sódio	0,5 g/L
Cloreto de magnésio	0,94 g/L
Sulfato de magnésio	1,2 g/L
Glucose	3,6 g/L

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHPN, utilizando malato como fonte de carbono a 30°C sob agitação (120 rpm) (KLASSEN et al., 1997).

O meio NFb-malato apresenta a seguinte composição:

MgSO ₄ .7H ₂ O	2 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2 x 10 ⁻² g/L
Malato de sódio	5 g/L
Biotina	1 x 10 ⁻⁴ g/L
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	2 x 10 ⁻³ g/L
MnSO ₄ . H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g/L
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO ₄ .5 H ₂ O	8 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁴ g/L

A mistura de fosfatos (7,975 g/L de KH₂PO₄ e 0,89 g/L de K₂HPO₄) foi autoclavada separadamente e adicionada fria ao meio em um volume de 50 mL/L. Foi adicionado também 20 mmol/L de cloreto de amônio 1 mol/L.

3.3 ANTIBIÓTICOS

As soluções estoque dos antibióticos utilizados foram preparadas segundo SAMBROOK et al., 1989 e estão listadas na tabela 3.

Tabela 3 - Antibióticos utilizados neste trabalho

Antibióticos	Concentração Final
Ampicilina (Amp)	250 µg/mL
Canamicina (Km)	50 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	20 µg/mL

3.4 MANIPULAÇÃO DE DNA

3.4.1 Mini-preparação de plasmídeos

Alíquotas de 1,5 mL de culturas de *E. coli* cultivadas em meio LB a 37°C sob agitação constante (120 rpm) por aproximadamente 16 horas, foram coletadas por centrifugação a 11.300 g por 1 minuto.

O precipitado de células foi ressuspenso em 150 µL de solução gelada GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L) e lisado com a adição de 150 µL de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%), a amostra foi homogeneizada por inversão até a ocorrência da lise.

O lisado foi neutralizado pela adição de 150 µL de 3,0 mol/L de acetato de potássio e 1,8 mol/L de ácido fórmico, a mistura foi homogeneizada e incubada em banho de gelo por 15 minutos. Após centrifugação de 5 minutos a 11.300 g, ao sobrenadante foi adicionado 50 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 11.300 g e a fase aquosa foi coletada em tubo novo. A esta fase aquosa foi adicionado 1 volume de isopropanol seguido de incubação por 15 minutos, para que ocorra a precipitação do DNA. Após 5 minutos de centrifugação a 11.300 g, o DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a

11.300 g. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco e dissolvido em água ultrapura estéril.

3.4.2 Extração e purificação de DNA genômico de *H. seropedicae*

Dez mililitros de cultura de células de *H. seropedicae*, cultivadas em meio NFbHP contendo 20 mmol/L de NH₄Cl, foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 10 mL de tampão GET (50 mmol/L glicose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,8, 10 mmol/L EDTA pH8,0) e centrifugadas por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado, ao precipitado foi adicionado 500 µL de tampão GET e foi adicionado 10 µL de lisozima (20 µg/mL) seguido de incubação a 30°C por 6 horas. Após esse período foi adicionado 1% de SDS e a suspensão foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi incubado com 20 µL de proteinase K 200 µg/mL a 50°C por 12 horas. Após esse período foi adicionado 500 µL de fenol equilibrado pH 8,0 agitando lentamente até obter uma mistura homogênea e a amostra foi centrifugada a 11.300 g por 15 minutos.

O sobrenadante foi extraído 2 vezes com 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após a extração ao sobrenadante foi adicionado um volume de isopropanol e centrifugado a 11.300 g por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 1 volume de etanol 80% e centrifugado a 11.300 g por 10 minutos. O precipitado foi seco e dissolvido em 100 µL de água ultrapura estéril.

3.4.3 Eletroforese em gel de ágar

As eletroreses em gel de ágar foram realizadas segundo SAMBROOK et al., (1989). Os géis foram preparados na concentração desejada, em tampão TBE 1x (89 mmol/L de Tris base, 89 mmol/L de ácido bórico e 2 mmol/L de EDTA pH 8,0). Para a corrida eletroforética foi utilizado o mesmo tampão em que o gel foi preparado.

As amostras foram misturadas em tampão FSUDS (azul de bromofenol 0,025%; xileno cianol 0,025%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em tampão (10 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mmol/L de EDTA pH 8,0) na proporção de 4 partes de corante para 1 de amostra.

As corridas eletroforéticas foram realizadas a 60V durante um período variável de acordo com a concentração de ágar e o tamanho do fragmento de DNA. Após a corrida, o DNA foi tratado com uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador. Os perfis eletroforéticos foram registrados por câmera CCD (sistema Biochemi, UVP).

3.4.4 Preparo de células eletrocompetentes e transformação por eletroporação

Para o preparo de células eletrocompetentes, primeiramente foi preparado um pré-inóculo com a inoculação de uma colônia de bactéria *E. coli* estirpe Top10, em 5 mL de meio LB seguido de incubação a 37°C por 12 horas sob agitação constante (120 rpm). Após esse período 500 µL deste pré-inóculo foram reinoculados em 50 mL de meio SOB e incubado a 37°C sob agitação constante até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,5 a 0,8.

A cultura foi resfriada em banho de gelo por 30 minutos e as células foram coletadas por centrifugação (2.500 g, 4°C por 5 minutos) e lavadas duas vezes com água ultrapura estéril gelada. As células eletrocompetentes foram ressuspensas em glicerol 15% e centrifugadas (2.500 g, 4°C por 5 minutos) o precipitado foi ressuspensado no glicerol remanescente, aliquotadas e estocadas em freezer a -70°C.

Para a eletroporação, foram adicionados 2,0 µL de ligação às alíquotas de 40 µL de células eletrocompetentes. As amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação e submetidas a uma corrente elétrica de 400 mV.

Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 1 mL de meio SOC por 30 minutos a 37°C, plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos adequados e incubadas a 37°C.

3.4.5 Marcação radioativa dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) foram marcados com $\gamma^{32}\text{P}$, o sistema de reação continha tampão de reação para concentração final de 1X, 1pmol de oligonucleotídeo reverso, 10U Polinucleotideo kinase, 20 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP e água ultrapura estéril em quantidade suficiente para volume final de 10 μL . A reação foi incubada durante 14 a 18 horas em temperatura ambiente. A enzima foi inativada a 70°C por 10 minutos, os primers marcados radioativamente foram utilizados em reações de amplificação por PCR gerando produtos que foram utilizados nos experimentos de interação DNA-proteína.

3.4.6 Amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores marcados radioativamente

O DNA genômico de *H.seropedicae* estirpe SmR1 foi utilizado como molde para reação de PCR. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) complementares às regiões promotoras dos operons *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1* foram construídos e as seqüências estão representadas abaixo:

Primers para região promotora do gene *narX*:

NARX-for 5' TCGAACTGAAGCCGGAACGC 3'

NARX-rev 5' ATTTCCAGCGCCAGTCCCAG 3'

Primers para região promotora do gene *narK*:

NARK-for 5' AATGGGCATCATCGCCTTCCA 3'

NARK-rev 5' TGCCTCGGTTCAAGCGGACG 3'

Primers para região promotora do gene *narK1*:

NARK1-for 5' GGAGCAGATCTTGAGCCAC3'

NARK1-rev 5' GTTGAGCTGCAGGGCGTT 3'

O sistema de reação foi composto por cerca de 1-5 ng/mL de DNA molde, 0,4 pmol de cada primer (primer reverso marcado com ^{32}P), 0,25 mmol/L de dNTP, tampão de reação para concentração final de 1X, 2,5 U de Taq DNA Polimerase, 3,75 mmol/L de MgCl_2 e quantidade de água ultrapura estéril suficiente para 20 μL .

O programa para amplificação utilizado foi: um ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 53°C (para *nark1*) ou 61°C (para *narX* e *narKnirBDC*) e um ciclo de 1 minuto e 30 segundos a 72°C, 5 minutos a 72 °C.

Após o término da amplificação os produtos resultantes da amplificação foram purificados com auxílio do Kit de purificação GFX PCR DNA and gel band purification Kit (GE Healthcare) e utilizados em ensaios de interação DNA-proteína.

3.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes foi segundo LAEMMLI, 1970. O gel de poliacrilamida possuía 0,75 mm de espessura, a concentração de acrilamida no gel de empilhamento era de 4% e no gel separador de 12% e a relação acrilamida:bis-acrilamida de 20:1. As corridas eletroforéticas foram realizadas em voltagem constante de 150 V e a proteína foi corada com Coomassie Brilliant Blue R-250.

As análises densitométricas foram realizadas utilizando Personal Densitometer SI, Molecular Dynamics.

Os ensaios de retardamento de banda em gel foram realizados em gel não desnaturante de poliacrilamida 4,5% e com relação de acrilamida:bis-acrilamida de 29:1. O gel foi preparado em tampão Tris-glicina (25 mmol/L Tris-

HCl pH 8,3 e 192 mmol/L Glicina) as corridas foram mantidas em voltagem constante de 70V por aproximadamente 2 horas a 4°C.

3.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA His-NtrX

Colônias de bactérias *E. coli* estirpe BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pJHO2 (que contém o gene *ntrX*), inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas por 12 horas a 37°C sob agitação constante (200 rpm).

Um volume de 3 mL dessa cultura foi re-inoculado em 300 mL de meio LB e mantido a 37°C sob agitação constante, até atingir uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,5. A essa cultura, foi adicionado 0,5 mmol/L do agente indutor de expressão IPTG (isopropil β-D tiogalactosídeo) seguido de incubação a 20°C por 16 horas. Após indução as células foram recuperadas por centrifugação durante 15 minutos a 2.000 *g* a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mmol/L pH8,0, Imidazol 20 mmol/L, NaCl 250 mmol/L, glicerol 10%).

As células ressuspendidas foram lisadas através de sonicação em 6 ciclos de 20 segundos com intervalos de 30 segundos. Após a lise o material foi centrifugado por 30 minutos a 27.000 *g* a 4°C e as frações solúvel e insolúvel foram separadas.

A proteína His-NtrX foi purificada em coluna de afinidade HiTrap Chelating (5 mL) carregada com níquel (Ni⁺²) (GE Healthcare), preparada como descrito pelo fabricante e acoplada ao sistema de purificação Äkta (GE Healthcare).

A eluição da proteína foi feita em gradiente segmentado de imidazol em tampão (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0; NaCl 250 mmol/L; glicerol 10%). Após a injeção da amostra na coluna de purificação, foram injetados 5 volumes de coluna de tampão contendo 20 mmol/L de imidazol, em seguida foi feito um gradiente linear de 20 a 300 mmol/L de imidazol equivalentes a 5 volumes de coluna. Frações de 1,5 mL contendo a proteína purificada foram reunidas e dializadas em tampão de diálise (HEPES 50 mmol/L pH 8,0; NaCl 250 mmol/L; glicerol 50%) sob agitação constante durante 14 a 18 horas em geladeira, após diálise a proteína foi alíquotada e armazenada em nitrogênio líquido

3.7 ENSAIO DE RETARDAMENTO DE BANDA EM GEL

Os fragmentos de DNA utilizados nas reações foram obtidos através de amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeo iniciador reverso marcado radioativamente (item 3.4.7).

A proteína ^{His}-NtrX purificada e os fragmentos de DNA foram incubados em tampão TAP (50 mmol/L Tris acetato pH8,0; 100 mmol/L de acetato de sódio; 8 mmol/L de acetato de magnésio; 27 mmol/L de acetato de amônio; 1 mmol/L de ditioneitol e 3,5% de PEG) (POPHAM et al., 1989), por 10 minutos a 30°C. Após o período de incubação foi adicionado tampão de amostra (glicerol 50% e 0,001% de azul de bromofenol) e aplicado em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,3; 192 mmol/L Glicina) a 70V por aproximadamente 2 horas a 4°C. O gel foi seco e analisado em Storm scanner (Molecular Dynamics).

3.8 FOSFORILAÇÃO *in vitro* DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX

A proteína ^{His}-NtrX purificada foi fosforilada utilizando Carbamoil Fosfato. O sistema de reação contendo a proteína ^{His}-NtrX, tampão TAP (50 mmol/L Tris acetato pH8,0; 100 mmol/L de acetato de sódio; 8 mmol/L de acetato de magnésio; 27 mmol/L de acetato de amônio; 1 mmol/L de ditioneitol e 3,5% de PEG) (POPHAM et al 1989), 10mmol/L de Carbamoil Fosfato, foi incubada por 15 minutos a 30°C.

Em seguida, o DNA marcado radioativamente foi adicionado na reação e incubada por 10 minutos a 30°C. Após este período de incubação, foi adicionado à mistura, tampão de amostra (glicerol 10% e 0,001% de azul de bromofenol) e aplicada em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,3; 192 mmol/L Glicina) a 70V por aproximadamente 2 horas a 4°C. O gel foi secado e analisado no Storm scanner (Molecular Dynamics).

3.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi feita segundo Bradford (1976), baseada na ligação de proteínas ao Comassie Brilliant Blue G-250. Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada com padrão.

3.10 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA EM MALDI-TOF

Os ensaios para investigar a formação de dímeros da proteína NtrX foram realizados em MALDI-TOF. Para as análises em MALDI-TOF foi utilizada a proteína ^{His}-NtrX purificada. O sistema de reação continha 2 µg de proteína ^{His}-NtrX, 50 mmol/L tampão HEPES pH 8,0, NaCl 250 mmol/L e 1,5% de glutaraldeído. O sistema foi incubado por 15 minutos a 37°C, então um 1 µL da reação foi misturada em 9 µL de solução de matriz (acetonitrila 50%, ácido trifluoroacético 0,1% saturada com matriz HCCA (ácido sinapínico)). Em seguida, 2 µL desta mistura foram aplicados em placa de espectrometria de massa (MTP 384 massive MS target T - Bruker Daltonics) os espectros de massa foram coletados em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF/MS "Autoflex" (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) utilizando modo linear positivo com voltagem de 20 kV e tempo de espera de 330ns. A lista de picos foi criada com algoritmo SNAP (Sophisticated Numerical Annotation Procedure) utilizando o software Flex Analysis 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

3.11 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DA PROTEÍNA NtrX DE *H. seropedicae*

A sequência do gene *ntrX* de *H. seropedicae* foi traduzida utilizando o programa Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>). Para a análise da sequência de aminoácidos da proteína NtrX, foi utilizado o programa Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e os aminoácidos conservados foram identificados pelo programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

O domínio HTH de ligação ao DNA da proteína NtrX de *H. seropedicae*, foi identificado utilizando o programa Helix-turn-helix motif prediction (<http://npsa->

pbil.ibcp.fr/cgi-in/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_ hth.html) e para a região N-terminal o programa ScanProsite (<http://www.expasy.ch/prosite/>).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NtrX DE *H. seropedicae*

NtrX é uma proteína ativadora de transcrição que juntamente com a proteína NtrY, faz parte de um sistema regulatório de dois componentes. A proteína NtrX pode apresentar três domínios: o receptor de sinal (região que possui o resíduo de aspartato que é fosforilado pelo seu par sensor), o domínio AAA+ (envolvido com a hidrólise de ATP, formação do complexo aberto, interação com o fator sigma 54 da RNA polimerase e oligomerização) e hélice-volta-hélice (ligação ao DNA), ou apenas dois domínios: o receptor de sinal e o hélice-volta-hélice, como ocorre com a proteína NtrX de *H. seropedicae*.

A sequência de DNA do gene *ntrX* de *H. seropedicae* foi cedida pelo programa GENOPAR, essa sequência foi traduzida utilizando o programa Transeq. Análise do domínio regulador de resposta da proteína NtrX de *H. seropedicae* utilizando o programa Prosite, revelou que a proteína possui um aminoácido aspartato (D) localizado na posição 52. Provavelmente é a fosforilação desse aspartato pelo seu par sensor que induz a uma mudança conformacional da proteína, levando a regulação da expressão de genes alvo (Figura 7) (STOCK, ROBINSON e GOUDREAU, 2000). A região de ligação ao DNA foi determinada pelo programa Helix-turn-helix Motif Prediction, o qual apresentou aproximadamente 100% de probabilidade de que na posição 214 a 235 há o motivo hélice-volta-hélice (Figura 8).

Figura 7 - ANÁLISE DO DOMÍNIO REGULADOR DE RESPOSTA DA PROTEÍNA NtrX DE *H. seropedice*

MANILVVDD~~EMGIRELLSEILGDEGHVVTTAENAQQARELRQAGVPDLVLLDIWMPD~~TDGVTLL
 KEWQRDGLLTMPVIMMSGHATIDTAVEATRIGALNFLEKPIALQKLLKAVQQGLSHSREAVRPA
 GYRPAPVAAVVNGAADGLHTPEHAAPVAAAYAPALGGEPLHHGTTASTPFGQVADNAANISFDLP
 LREARDAFERAYFEYHLVRENGSMTRVAERTGLERTHLYRKLKQLGVEPGKLARKNH

Fonte: Prosite.<http://www.expasy.ch/prosite/>

Análise da proteína NtrX de *H. seropedicae* utilizando o programa Prosite. Em amarelo, região que corresponde ao domínio regulador de resposta; em verde aminoácido aspartato (D) na posição 52.

Figura 8 - DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA DA PROTEÍNA NtrX DE *H. seropedicae*

	10	20	30	40	50	60
MANILVVDD	EMGIRELL	SEILGDEGH	VVTTAENA	QQARELRQ	AGVPDLVLL	DIWMPD
TDGVTLL	KEWQRDGL	LTMPVIMM	SGHATIDT	AVEATRIG	ALNFLEKPI	ALQKLLKAV
QQGLSH	SREAVRPA	GYRPAPV	AAVVNGA	ADGLHTPE	HAAPVAA	AYAPALGGE
PLHHGTT	ASTPFGQV	ADNAANI	SFDLPLR	EARDAFE	RAYFEYH	LVRENGSM
TRVAERT	GLERTH	LYRKLK	QLGVE	PGKLARK	NH	

Fonte: http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hth.html

Localização do domínio de ligação ao DNA da proteína NtrX de *H. seropedicae* utilizando o programa Helix-turn-helix Motif Prediction. Em vermelho domínio de ligação ao DNA (HTH) com 100% de probabilidade entre os aminoácidos 214 a 235.

O alinhamento da sequência dos aminoácidos da proteína NtrX de *H. seropedicae* utilizando o programa Blastp, demonstrou que a proteína possui grande identidade com os seguintes organismos: *Janthinobacterium sp. Marseille* (72%), *Herminiimonas arsenicoxydans* (71%), *Ralstonia pickettii* (69%) e *Burkholderia sp. H160* (68%), todos pertencentes a classe das β -proteobactérias. Esta identidade pode ser visualizada através do alinhamento da sequência de aminoácidos entre a proteína NtrX desses organismos, utilizando o programa ClustalW2, no qual podemos observar que as regiões N-terminal e C-terminal que correspondem respectivamente ao domínio receptor de sinal e de ligação ao DNA, são bem conservadas (Figura 9). Na região N-terminal das proteínas NtrX alinhadas, o aminoácido aspartato (D) na posição 52 é conservado entre esses organismos (Figura 9).

As sequências de aminoácidos das proteínas NtrX de diferentes organismos pertencentes a classe α -proteobactéria foram comparadas com a proteína NtrX de *H. seropedicae*, para identificar regiões conservadas utilizando o programa ClustalW2. Como podemos observar na figura 10, a proteína NtrX de *H. seropedicae* possui a região reguladora de resposta e a de ligação ao DNA conservada, entre as proteínas NtrX de outros organismos pertencentes ao Filo Proteobacteria, porém não possui o domínio de AAA+. O aminoácido aspartato (D) está presente entre todos os organismos alinhados.

Figura 10- ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NtrX DE *H.seropedicae* COM A SEQUÊNCIA DE NtrX DE ORGANISMOS PERTENCENTES A CLASSE α -PROTEOBACTÉRIA

Azorhizobiun	--MAHDILIVDDEPDISGLVAGILEDEGYSARTARDADGALAEIAARRPNLIFLDIWLQGS	59
Rhodobacter	--MSSILIVDDEPDIKRELIGDILRDEGFQIRLAANSDECMAAVNAEPPALMILDIWLKDS	58
Rickettsia	MSQLDVLILDDEESIRNLIANLKDDEGFNPKVAANSTQALKIISEKPVSAVILDIWLQGS	60
Herbaspirillum	--MANILVVDEEMGIRELLSEILGDEGHVVTAENAQQARELRQAGVPDLVLLDIWMPDT	58
Azospirillum	MSAATILVADDDRAIRTVLTQALARLGHVTRTGNASTLWRVWVADGGQDLIITDVVMPDE	60
	:*:*:*:* * : : * * . : : : * : * : .	
Azorhizobiun	RLDGLLELLDIKKRE-HPEVPPVVMISGHGNIETAVAAIKRGAYDFIEKPFNADRLVVI	118
Rhodobacter	RMDGIDILKRTKRD-NPDPVPVVIISGHGNIETAVAAIKQAYDFIEKPFNIDQLMVVQR	117
Rickettsia	EIDGLGVLEIITKKR-YPLIPVIIISGHGTIETAVNAIKMGAYDYIEKPFNNDKLIILLKR	119
Herbaspirillum	--DGVTLLEKQWQDGLLTPVIMMSGHATIDTAVEATRIGALNFLEKPIALQKLLKAVQQ	116
Azospirillum	--NGLDLIPRIKKI-RPDLRIIVMSAQNTLITAVKAAERGAFFYLPKPFDLKELVSVVER	117
	:*:*:* * : : : : : * * * . * * : : * * : . * * : :	
Azorhizobiun	ALETLRRLREVRLEKQL-TQPHTMVGRSSVIQQLRATVDRVGTNSRILIVGPSGSGKEL	177
Rhodobacter	AMETARLRRENSELRRRVDVSAEMLGGSTAYRLLKSQLEKVTKSNGRVMLSGPAGAGKEL	177
Rickettsia	ACEVTKLKRNIIDLKSKVIDKTELVGGCSVTLKYKMEIEKAASSSSRIMIHGKVGSGKEL	179
Herbaspirillum	GLSHSFEAVR-----PAGYRPAP	134
Azospirillum	ALNSNTPPAALPADAGEADEQLPLIGRSPAMQEIYRVLARLMGTDLTVTITGESGTGKEL	177
	. . *	
Azorhizobiun	TARMIHAASARAQGFVVINAAAITPERLEYELFG-VEEGEGRERHRGA--LEEAHGGTL	234
Rhodobacter	AARFIHANSGRAGAPFISVSSATVPEPRMEEVLFGR-RETAE-RGIEQGL--LEQAHGGIV	233
Rickettsia	AARLIHKQSKRVNPFIIIFSPTCMTTEKINQELFGSEKQENNNKRPETI--LEFANNGTL	237
Herbaspirillum	VAAVNGAADGLHTPEHAAPVAAYAP-----ALGGEP--LHHGTTAST	175
Azospirillum	VARALHDYGKRRNGPFVAINMAAIPRELIESEELFGHEKGAFTGATNRSTGRFQVQGGTL	237
	. * : : . * : .	
Azorhizobiun	FLDEIADMPRETQNRVLRVLVEQTFSRIGSSEKVRVDVRIISSTGRHLEEEIAAGRFPED	294
Rhodobacter	YFDEVADMPDGTQSKILRVLTEQQFTRQGGTDKVRVDLRVISSTTRDLRTEIAAGRFQOE	293
Rickettsia	YIDEVSNIPPIQVLLKFLKQDTITKPCG-KKTKVDIKIITSTSKNIQDEVNNGKPLED	296
Herbaspirillum	PFQQVADNAANIS-----	188
Azospirillum	FLDEIGDMPLEAQTRLRLVLEGEYTTVGGRTPIKTDVRIVAATHRDLRTLIRQGLFPED	297
	: : : : : .	
Azorhizobiun	LYHRLSVVPIRVPPLAERREDIPDLVDFFDLISQTTGLQRRKVGEDAMAVLQSHDWPGN	354
Rhodobacter	LYDRLNVVPIEVPALTDREDDIPMLARHFIEFMHRSQGLPLRSLTSEAEAMLQTMPWPGN	353
Rickettsia	LYYRLNVFSLKVPVSLYERKEDIPLLVKYFVKQLSKFSGLKERHFSDEAITALQSYEWPNG	356
Herbaspirillum	-----FDLPLR-----	
Azospirillum	LFYRLCVVPIRLPPLRERTEDVPLLRHFLNQCS-AQGLPVKSIDQPAMDRLKRYRWPGN	356
Azorhizobiun	VRQLRNNVERLLILAGGDP--DAEVTASMLPPDVGALVPTLPNGNGGHEHLMGLPLR----	408
Rhodobacter	VRQLRNVIERVLILGDG----SGPIEARELPNGEPGEEGRILIGG--ALATLPLR----	403
Rickettsia	IRQLRNVVEWTLIMNPLTTGNEIIPYMIPEILANSANLTKLEDSFDMLSMPLR----	412
Herbaspirillum	-----FDLPLR-----	194
Azospirillum	VRELENLVRRLAALYSQEVIGLDVVEAELADTPAAQPVVEPQGEGLSAAVEPHLKYFA	416
	* :	
Azorhizobiun	-----EAREVFEREYLAQINRFGGNI SR TAEFVGMERSALHRKLLKALGVG-	454
Rhodobacter	-----EARELFEREYLLTQINRFGGNI SR TAAFVGMERSALHRKLLKSLGVVT	450
Rickettsia	-----EAREVFEREYLSAQMSRFNNNI SK TSSFVGMERSALHRKLLKLLSLHI	459
Herbaspirillum	-----EARDAFERAYFEYHLVRENGSMTRVAERTGLERTHLYRKLKQLGVPEP	241
Azospirillum	AHKDGMPSNGLYDRVLRVEVERPLISLSLSATRGNQIKAAQLLGLNRTLRKKIRDLDIQV	476
	. . . * * : : . . : : * * * . * : * * : * . :	
Azorhizobiun	-----	
Rhodobacter	TAKGGSRLARIEDDYEDDEEPLGAPD	476
Rickettsia	PPTNKIN----EEEYKANA-----	475
Herbaspirillum	GKLARKNH-----	249
Azospirillum	VRGLK-----	481

Alinhamento entre as proteínas NtrX, utilizando o programa ClustalW2 (THOMPSON et al., 1994). (*) aminoácidos idênticos; (:) aminoácidos conservados; (.) aminoácidos semi-conservados. *Azorhizobium* (*Azorhizobium caulinodans*), *Azospirillum* (*Azospirillum brasilense*), *Rickettsia* (*Rickettsia typhi str. Wilmington*) *Rhodobacter* (*Rhodobacter sphaeroides*) e *Herbaspirillum* (*Herbaspirillum seropedicae*). Em sublinhado e negrito aminoácido aspartato (D).

4.2 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX DE *H. seropedicae*

A proteína NtrX de *H. seropedicae* foi superexpressa a partir do plasmídeo pJHO2, o qual contém o gene que codifica para proteína NtrX, inserido no vetor pET28a (Novagen). O vetor pET28a expressa a proteína de interesse como uma proteína de fusão com seis resíduos de histidina (cauda his ou His-tag) na região N-terminal, por esse motivo, a proteína NtrX expressa com a cauda his foi chamada de ^{His}-NtrX. A cauda com as histidinas facilita o processo de purificação da proteína em coluna de afinidade, aumentando o rendimento e a pureza da proteína purificada (OSAKI, 2007).

Em estudos anteriores a proteína ^{His}-NtrX foi superexpressa a partir do plasmídeo pJHO2 utilizando os agentes indutores lactose (0,5%) e IPTG (0,5 mmol/L) sob temperatura de incubação de 30°C e 37°C. Porém nestas condições a proteína permaneceu em sua maior parte na fração insolúvel 94% e 96% respectivamente. Com lactose houve um aumento na solubilidade da proteína em 30°C e 37°C onde 47% e 5% da ^{His}-NtrX permaneceram na fração solúvel (OSAKI, 2007).

Com objetivo de aumentar a solubilidade de ^{His}-NtrX outra condição de indução foi testada, na qual a expressão da proteína foi feita sob temperatura de 20°C por 16 horas. A superexpressão da proteína ^{His}-NtrX foi feita em *E. coli* estirpe BL21(DE3) contendo o plasmídeo pJHO2, segundo descrito em Materiais e Métodos (item 3.6). A indução da ^{His}-NtrX foi feita com a adição de 0,5 mmol/L do agente indutor IPTG (isopropil β-D tiogalactosídeo) e mantida sob incubação a 20°C por aproximadamente 16 horas.

Esta condição de expressão levou a um aumento expressivo da solubilidade da proteína permanecendo 47% na fração solúvel, enquanto que a 30°C e a 37°C a proteína permaneceu apenas 6% e 4% solúvel

respectivamente. A indução em baixa temperatura faz com que a proteína seja expressa mais lentamente, devido a diminuição do metabolismo da bactéria. Essa expressão lenta possibilita com que a proteína possa assumir sua conformação adequada, permanecendo assim solúvel.

Após a indução, a proteína ^{His}-NtrX foi purificada segundo descrito em Materiais e Métodos (item 3.6), foi utilizada uma coluna de afinidade HiTrap Chelating carregada com níquel (Ni^{+2}) (GE Healthcare). Para a purificação da proteína foi utilizado um método diferente do utilizado por Osaki (2007), no qual a proteína era eluída em gradiente linear de 0 a 500 mmol/L de imidazol. Este método foi modificado para aumentar a pureza da proteína purificada.

Ao tampão de sonicação foram adicionados 20 mmol/L de imidazol e a proteína foi eluída em gradiente segmentado de imidazol, que após a injeção da amostra na coluna de purificação, foi injetado tampão contendo 20 mmol/L de imidazol, em seguida foi feito um gradiente linear de 20 a 300 mmol/L de imidazol. A proteína foi eluída em tampão contendo 240 mmol/L de imidazol. As frações que continham a proteína purificada foram reunidas e dializadas contra tampão de diálise (HEPES 50 mmol/L pH 8,0; NaCl 250 mmol/L; glicerol 50%).

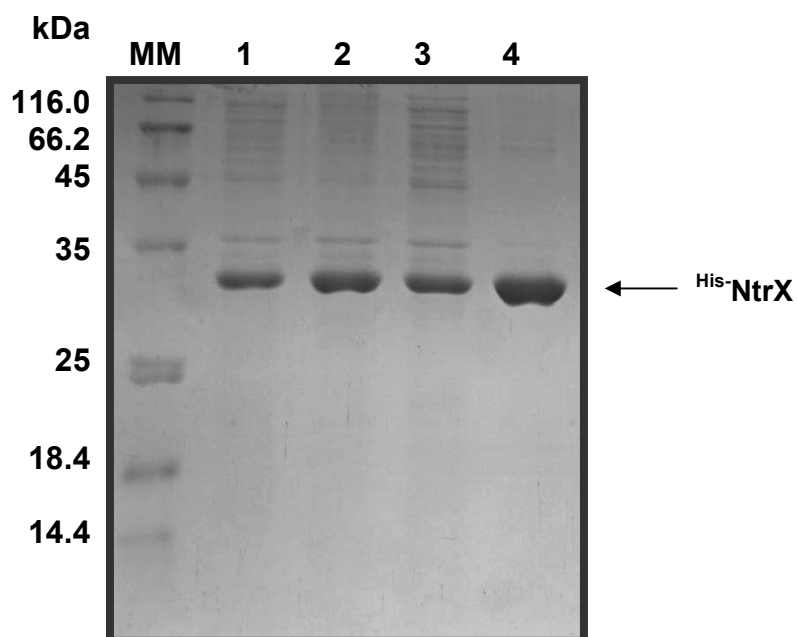
Nesta etapa de diálise da proteína foi utilizado o tampão contendo HEPES, pois foi observado que a proteína ^{His}-NtrX se mantinha estável e com atividade por um longo período de tempo na presença deste composto, diferente do que ocorria com tampão de diálise contendo Tris.

Após a diálise, a proteína foi armazenada em alíquotas em nitrogênio líquido. A proteína foi purificada com 94% de pureza e concentração de 3,24 mg/mL (Figura 11 e Tabela 2). A modificação no processo de purificação, do gradiente linear para segmentado, aumentou a pureza da proteína de 81% para 94%.

TABELA 2- ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX EXPRESSA EM *E. coli* BL21(DE3)

Fração	Proteína Total (mg)	Pureza (%)	Rendimento(%)
extrato	126	–	–
solúvel	69.6	–	100
HiTrap Chelating	20	94	29

Figura 11- PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX DE *H. seropedicae*



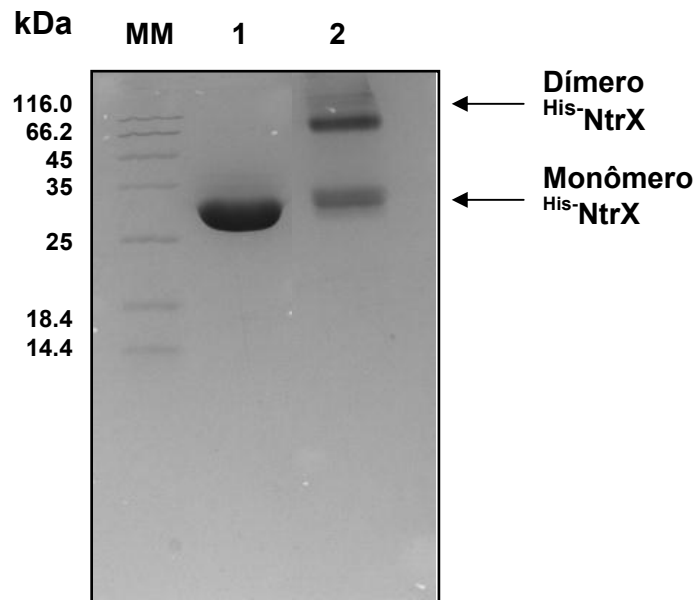
Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% do extrato de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pJHO2. MM: marcador de massa molecular em kDa (FERMENTAS); Linha 1: extrato bruto de células lisadas; Linha 2: fração insolúvel; Linha 3: fração solúvel; Linha 4: 3 µg de ^{His}-NtrX purificada; As proteínas foram coradas com corante Comassie Blue. A seta indica a proteína ^{His}-NtrX.

Ensaio de interação proteína-proteína foram realizados para verificar se a proteína ^{His}-NtrX de *H. seropedicae* era capaz de formar dímeros em solução, uma vez que a formação de dímeros entre proteínas regulatórias de resposta é comum. Conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.10), a proteína ^{His}-NtrX foi incubada em tampão contendo HEPES 50 mmol/L pH 8,0, NaCl 250 mmol/L juntamente com 1,5% de glutaraldeído. Após a incubação, uma alíquota foi submetida a análise em MALDI-TOF/MS e outra foi aplicada em gel SDS-PAGE 12%.

O glutaraldeído é um agente formador de “crosslink”, que possui dois grupos aldeído um em cada extremidade. A interação proteína-proteína (crosslink) se dá pela formação de ligações covalentes entre o aldeído do agente e o grupo amina da proteína que está próxima. Desta forma se a proteína ^{His}-NtrX formar dímeros as proteínas ficarão ligadas covalentemente pela ação do glutaraldeído (KIERNAN, 2000).

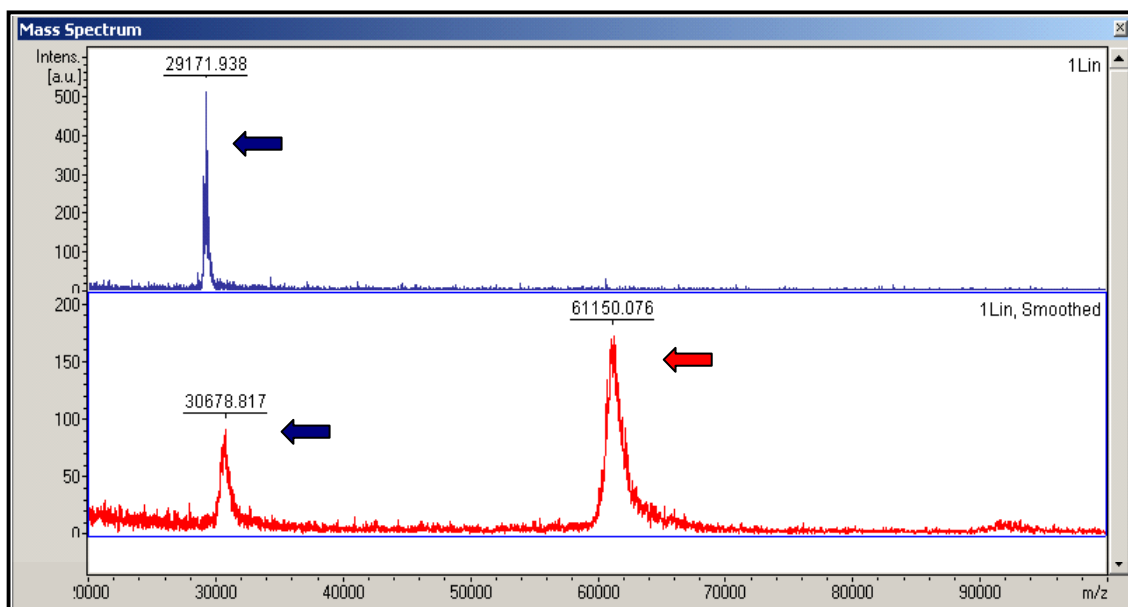
No gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% foi possível observar o aparecimento de uma banda com massa correspondente ao dobro da massa do monômero, indicando que ocorreu a formação de dímeros da proteína ^{His}-NtrX (Figura 12). Foi realizada também a análise em MALDI-TOF/MS da reação de interação entre ^{His}-NtrX purificada, que confirmou que a proteína possui a capacidade de formar dímeros quando em solução, devido ao aparecimento de um pico de massa em torno de 61 kDa correspondente ao dobro do monômero que é de aproximadamente de 29 kDa (Figura 13). É possível observar nas figuras 12 e 13, que além do aparecimento da banda e do pico que correspondem ao dímero, também foram observados a banda e o pico correspondentes ao monômero, indicando que a proteína encontra-se nessas duas formas na mesma solução. Esta interação proteína-proteína é independente da fosforilação da proteína ^{His}-NtrX .

Figura 12 - ENSAIO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA (DIMERIZAÇÃO) DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX de *H. seropedicae*



Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% do ensaio de dimerização da proteína ^{His}-NtrX. MM: marcador de massa molecular em kDa (FERMENTAS); linha 1: Reação sem a adição de glutaraldeído; linha 2: Reação com a adição de glutaraldeído. As proteínas foram coradas com corante Comassie Blue G-250.

Figura 13 - ESPECTRO DE MASSAS DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA DE ^{His}-NtrX DE *H. seropedicae*



Espectro de massas do ensaio de dimerização da proteína ^{His}-NtrX obtido em MALDI-TOF/MS. A reação foi realizada segundo descrito em Materiais e Métodos (item 3.10). Em azul o pico de massa correspondente a reação da proteína sem a adição de glutaraldeído. Em vermelho, pico correspondente a reação da proteína com a adição de glutaraldeído. Setas em azul indicam o pico correspondente ao do monômero da proteína ^{His}-NtrX e seta em vermelho indica o pico correspondente ao dímero da proteína ^{His}-NtrX.

4.3 ENSAIO *in vitro* DE LIGAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA ^{His}-NtrX E AS REGIÕES PROMOTORAS DOS OPERONS *narXL*, *narKnirBDCnasA* E *narK1* DE *H. seropedicae*

Estudos anteriores revelaram um possível envolvimento do operon *ntrY/X* de *H. seropedicae* na ativação dos genes envolvidos no metabolismo de nitrato, uma vez que a expressão das fusões promotor::*lacZ* dos operons *narKnirBDCnasA*, *narXL* foram consideravelmente reduzidas na estirpe mutante *ntrY* de *H. seropedicae* (ALVES, 2006).

Com base nesses estudos, ensaios de interação entre ^{His}-NtrX e as regiões promotoras dos operons *narXL*, *narKnirBDCnasA* e *narK1*, foram realizados para verificar o envolvimento da proteína reguladora de resposta NtrX de *H. seropedicae*, na regulação da expressão dos genes envolvidos no metabolismo de nitrato, uma vez que a proteína NtrX possui na região C-terminal o domínio de ligação ao DNA.

Para a realização dos ensaios de ligação as regiões promotoras dos operons foram amplificadas por PCR, utilizando como DNA molde o DNA genômico de *H. seropedicae* e apenas o oligonucleotídeo iniciador reverso marcado com material radioativo ($[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP), segundo descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7). Desta maneira os produtos resultantes da amplificação foram marcados somente em uma extremidade. Após a amplificação os produtos foram purificados utilizando o Kit de purificação GFX PCR DNA and gel band purification Kit (GE Healthcare).

A análise das regiões promotoras dos operons *narXL*, *narKnirBDCnasA* e *narK1*, estão mostradas na figura 14.

Figura 14 - REGIÃO PROMOTORA DOS GENES *narX*, *narK1* e *narK* DE *H. seropedicae*

- Região promotora do gene *narX*

NARX-for

agcgccatccgcgcagcga**tcgaactgaagccggaacgc**catgaattcaacgaggcgcc
 Sigma 54

acagaagatcgtgcgtttcatgtcacagacgggtggctag**ccggactgctggtgcag**t
 tcccaggctttctgctgcttttttaagaaacattgacttggcttccatacatgctggc
 RBS

aacgatgggcatagactgctgtcgttcccgcgccgag**taccctcatggaccctgcccgc**
cgctcccttcgcgccttgccccgcacaagcgcctgacctccgcatacctgctgatga
ccctcatcggcctgggctgacctgacggccatcggctataacctgctgctgtcctgg
caattggaaggcggcggcaccgtcatcaatgaagcgggcagcctgcgcatgcgctccta
 NARX-rev

ccagctgggactggcgcctggaat

- Região promotora do gene *narK1*

NARK1-for

ggagcagatcttgagccacccccgccgccccgcaactggccctcatgcgcgagcgcctcg
 acgacctgcgacccggccgcgcagcatcgccgatctgtgcagcgcctggcgcgccccgc
 agcgacgtgatgaacgccctgcccgcggttaccagcaggtcgccgaagacctgctggg
 acgcctggaagcaggcagcctctttaccgaagagagctgctccttcagtcagaaagacc
 tcaccgacagcctctcgacctggctggacaaggcgcagcagacgctggcgagcgactga
 aaagcgcgatgaagccggacttggaaagtgtcaccatttcttctgtcttgtccctccc
 gttcggactgagtaggccccaaagggccgta**tccaagcctgactcccgtgcttctoga**
 tacgcggtatgcccgtactcagtcggaacggtagtgtcagcgcctctcccttagccaa
 aagaactagtccttccggcagctcccctcctccttctcccttccccgcctcaccgacg
 Sigma 54

gaccgat**atggcccgctgcccctg**atcgctaagctgaagccatcgatcaacatccgcag
 RBS

gaggctccatgtccgaccgcgcaaggccaacggggtgctggcgtccagtacgctggcc
ttcactgtctgcttaccatctggaatgatgtttggcgtgacggcatcccgatcaagaa
 NARK1-rev

Cgccgtgcatctcaac

- Região promotora do gene *nark*

NARK-for

gcctgggactgggCGGGcatggccgctcgccctggccgga**aatgggcatcatcgcc**ttcca
gccgcgctgagcggatgcaccacggcagcgcgagcgcacccggacgatgcaactgcaccacg
aacgcgcagcctgcaactgcaatacatcacgcgatgatataaacgggCCgatcagctca
tcagcgcggttccccctgcaagcccccttccctcccgc[aa](#)accgctccaggcctggac

Sigma 54

ctgCGGataaaccctgTTg**ctggcagcactt**gctcaatgagggacagggctcagggat
gacccacatctgatgccgatccaacgagggatcagcagcgcacacggacaatgg**cgtc**

NARK-rev RBS

cgcttgaaccgaggcacggcgccttggggtcaggcgggCGcctttttgTTTTcaggaca
cgcc**atgagcaaagccaatcgtatcgagctgttttccccctgcggtcgccgcagatgcgcg**

Em verde as regiões onde os oligonucleotídeos iniciadores (primers) se anelam; em vermelho início do gene; em sublinhado o sítio de ligação do ribossomo (RBS), em azul sequência consenso para a ligação do fator de transcrição sigma 54 da RNA polimerase.

4.3.1 Ensaios *in vitro* de ligação entre a região promotora do operon *narXL* e a proteína ^{His}-NtrX de *H. seropedicae*

Os genes *narXL* de *H. seropedicae* fazem parte do sistema regulatório de dois componentes e estão envolvidos na regulação dos genes do metabolismo do nitrato. O gene *narX* codifica para uma proteína sensora transmembrana e *narL* para uma proteína reguladora de resposta. A região promotora do gene *narX* que foi utilizada para os ensaios de interação DNA-proteína continha 418 pb.

Os ensaios de interação DNA-proteína mostraram que a proteína ^{His}-NtrX é capaz de se ligar à região promotora de *narX*, o que pode ser observado na figura 15, na qual vemos que houve o aparecimento de uma banda com migração mais lenta a medida em que foram adicionadas concentrações crescentes da proteína ^{His}-NtrX. Essa banda provavelmente corresponde a formação do complexo DNA-proteína, pois o DNA ligado na proteína apresenta uma migração mais lenta, com relação ao DNA livre.

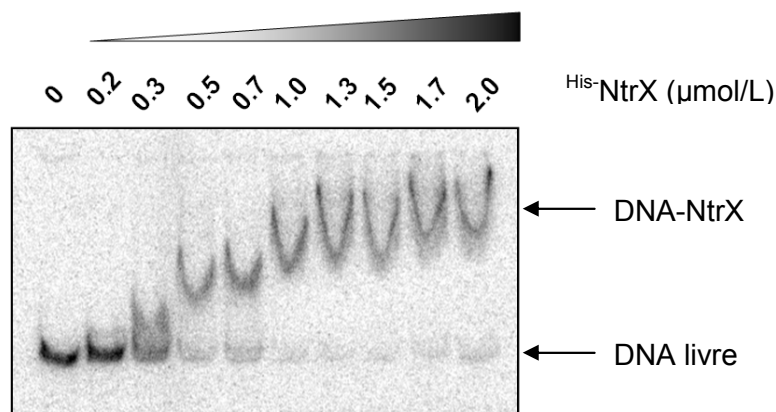
Para verificar a especificidade da formação do complexo, ou seja, se a proteína ^{His}-NtrX não liga a qualquer tipo de DNA presente na reação, foi realizado um ensaio utilizando como competidor heterólogo o DNA de timo bovino. Neste ensaio, foi adicionado à reação o DNA de timo em diferentes concentrações partindo de 0,75 µg de DNA de timo aumentando de 0,25 em 0,25 µg até 10 µg. De acordo com a figura 16 o DNA de timo não desestabilizou a formação do complexo DNA-proteína, indicando que ^{His}-NtrX liga especificamente ao promotor *narX* de *H. seropedicae*. Para os demais ensaios envolvendo a região promotora de *narX* foi estabelecida a adição de 1 µg de DNA de timo, para atuar como competidor heterólogo inespecífico.

Ensaios utilizando DNA homólogo não marcado radioativamente foram realizados, com o objetivo de reforçar a idéia de especificidade da interação ^{His}-NtrX com a região promotora de *narX*. Nestes ensaios foram adicionadas concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado, no entanto a concentração de DNA marcado e de proteína foram mantidas constantes. Conforme podemos observar na figura 17, a medida que a concentração de DNA não marcado foi sendo aumentada, ocorreu um deslocamento do

equilíbrio do DNA marcado pelo não marcado, o que pode ser visto com o aumento da intensidade da banda correspondente ao DNA marcado livre.

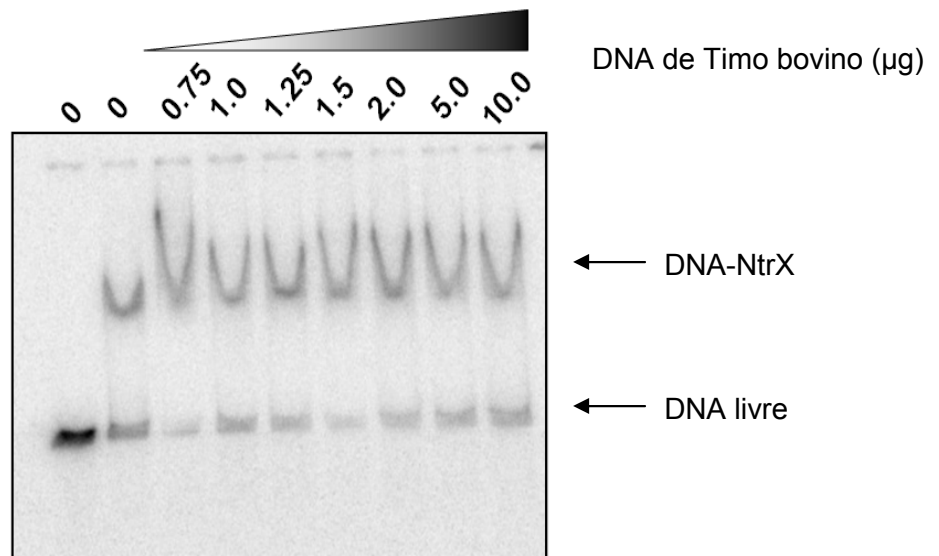
Uma vez que, proteínas regulatórias de resposta são ativadas por fosforilação e que análises de bioinformática da proteína NtrX revelaram a presença de um provável sítio de fosforilação na posição Asp 52 localizado no domínio regulador de resposta, ensaios utilizando carbamoil fosfato como doador de fosfato foram realizados. De acordo com a figura 18, podemos verificar que há uma maior formação do complexo DNA-proteína quando a proteína está fosforilada a partir de 0,3 $\mu\text{mol/L}$, em comparação com a proteína não fosforilada.

Figura 15 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA $^{\text{His}}$ -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *narX* DE *H. seropedicae*



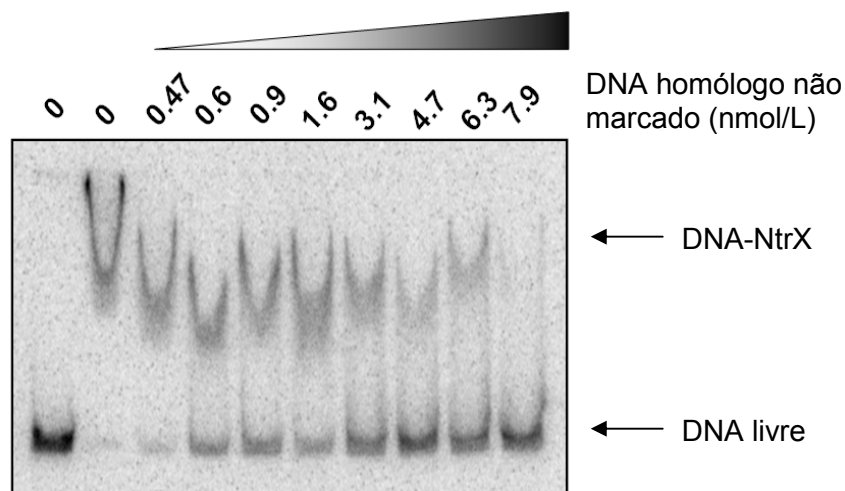
Concentrações crescentes de $^{\text{His}}$ -NtrX foram incubadas com o fragmento de 418 pb, correspondente a região promotora do gene *narX* marcada com $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7). Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narX* marcado radioativamente; linhas 2-10: promotor *narX* com concentrações crescentes da proteína $^{\text{His}}$ -NtrX. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

Figura 16 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *narX* DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE DNA DE TIMO BOVINO



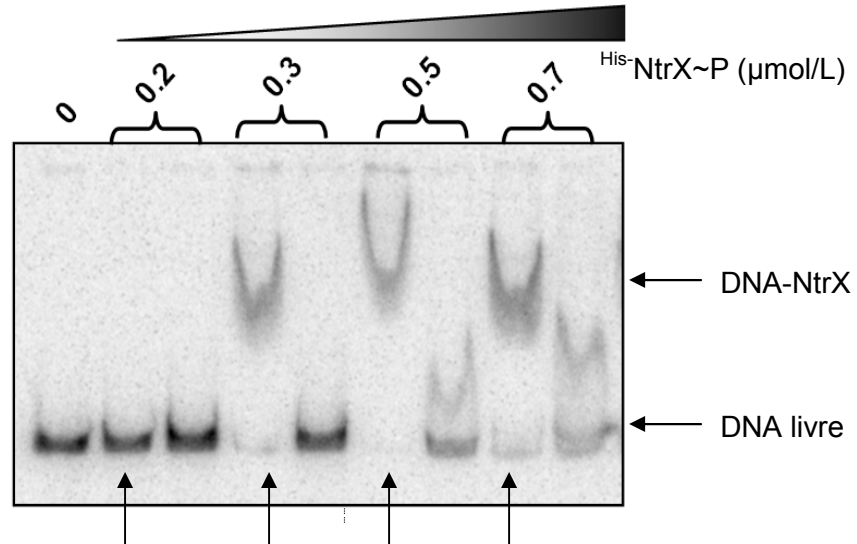
O fragmento de 418 pb, correspondente a região promotora do gene *narX* marcada com [γ -³²P] ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7) foi incubado com 1,5 μmol/L de ^{His}-NtrX e concentrações crescentes de DNA de Timo bovino. Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narX* marcado radioativamente; linha 2: promotor *narX* com 1,5 μmol/L de ^{His}-NtrX; linhas 3-9: promotor *narX* com 1,5 μmol/L de ^{His}-NtrX e concentrações crescentes de DNA de Timo bovino. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

Figura 17 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX A REGIÃO PROMOTORA DE *narX*, NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA HOMÓLOGO NÃO MARCADO



O fragmento de 418 pb, correspondente a região promotora do gene *narX* marcada com [γ -³²P] ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7) foi incubado com 1,5 μ mol/L de ^{His}-NtrX e concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado radioativamente. Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narX* marcado radioativamente; linha 2: promotor *narX* com 1,5 μ mol/L de ^{His}-NtrX; Linhas 3-10: promotor *narX* com 1,5 μ mol/L de ^{His}-NtrX e concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

Figura 18 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{35}S -NtrX FOSFORILADA COM CARBAMOIL FOSFATO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *narX*



Concentrações crescentes de ^{35}S -NtrX fosforilada com Carbamoil Fosfato (^{35}S -NtrX~P), conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8), foram incubadas com o fragmento de 418 pb, correspondente a região promotora do gene *narX* marcada com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7). Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narX* marcado radioativamente; linhas 2, 4, 6, 8: promotor *narX* com concentrações crescentes da proteína ^{35}S -NtrX~P; linhas 3, 5, 7, 9: promotor *narX* com concentrações crescentes da proteína ^{35}S -NtrX. As amostras foram analisadas em gel de poliácridamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7). As setas indicam as linhas aonde foi aplicada a proteína ^{35}S -NtrX~P.

4.3.2 Ensaios *in vitro* de ligação entre a região promotora do gene *narK1* e a proteína ^{His}-NtrX de *H. seropedicae*

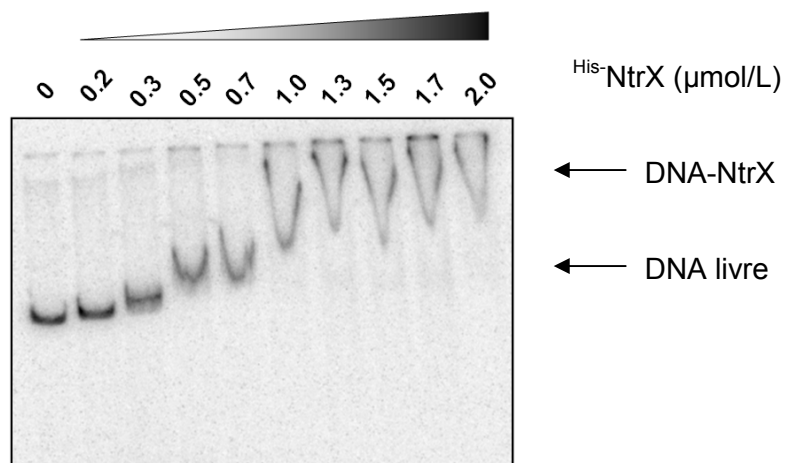
Em *H. seropedicae* o gene *narK1* forma um operon com os genes *narK1KnarGHJInasA* e codifica para uma proteína transportadora de nitrato. A proteína NarK1 é pertencente a família das proteínas transportadoras independentes de ATP, a superfamília dos facilitadores principais (MFS) (MARGER e SAIER, 1993). A região promotora do gene *narK1* que foi utilizada nos ensaios de interação proteína-DNA possuía 711 pb.

A proteína ^{His}-NtrX também foi capaz de se ligar ao promotor do gene *narK1*. Conforme pode ser verificado na figura 19, houve a formação do complexo proteína-DNA a medida que a concentração de proteína foi aumentada.

Nos ensaios utilizando concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado radioativamente, em que a concentração de DNA marcado e de proteína foram mantidas constantes, podemos observar que na medida em que a concentração de DNA não marcado foi sendo aumentada, ocorreu um deslocamento do equilíbrio do DNA marcado pelo não marcado, o que pode ser visto com o aumento da intensidade da banda correspondente ao DNA marcado livre (Figura 20).

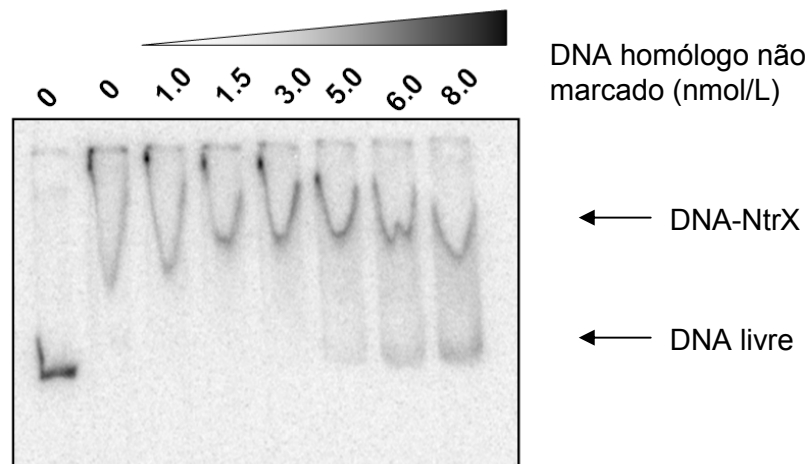
A proteína fosforilada (^{His}-NtrX~P) foi capaz de se ligar a região promotora de *narK1* a partir da concentração de 0,3 µmol/L de ^{His}-NtrX~P, ou seja, para o início da formação do complexo-DNA foi necessária uma menor concentração de proteína ^{His}-NtrX~P, quando comparada com a proteína não fosforilada que foi de 0,5 µmol/L (Figura 21).

Figura 19 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *narK1*



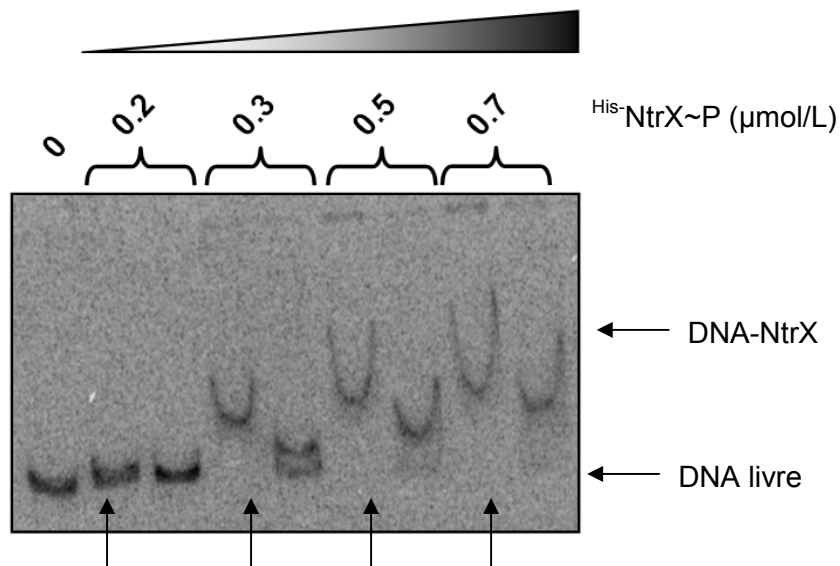
Concentrações crescentes de ^{His}-NtrX foram incubadas com o fragmento de 724 pb, correspondente a região promotora do gene *narK1* marcada com [γ -³²P] ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7). Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narK1* marcado radioativamente; Linhas 2-10: promotor *narK1* com concentrações crescentes da proteína ^{His}-NtrX. As amostras foram analisadas em gel de poliácridamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

Figura 20 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DE ^{32}P -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DE *narK1* NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA HOMÓLOGO NÃO MARCADO



O fragmento de 724 pb, correspondente a região promotora do gene *narK1* marcada com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7) foi incubado com 1,5 $\mu\text{mol/L}$ de ^{32}P -NtrX e concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado radioativamente. Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narK1* marcado radioativamente; Linha 2: promotor *narK1* com 1,5 $\mu\text{mol/L}$ de ^{32}P -NtrX; Linhas 3-10: promotor *narK1* com 1,5 $\mu\text{mol/L}$ de ^{32}P -NtrX e concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

Figura 21- ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{35}S -NtrX FOSFORILADA COM CARBAMOIL FOSFATO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *narK1*



Concentrações crescentes de ^{35}S -NtrX fosforilada com Carbamoil Fosfato (^{35}S -NtrX~P), conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8), foram incubadas com o fragmento de 724 pb, correspondente a região promotora do gene *narK1* marcada com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7). Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narK1* marcado radioativamente; Linhas 2, 4, 6, 8: promotor *narK1* com concentrações crescentes da proteína ^{35}S -NtrX~P; Linhas 3, 5, 7, 9: promotor *narK1* com concentrações crescentes da proteína ^{35}S -NtrX. As amostras foram analisadas em gel de poliácridamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7). As setas indicam aonde foi adicionada a proteína ^{35}S -NtrX~P.

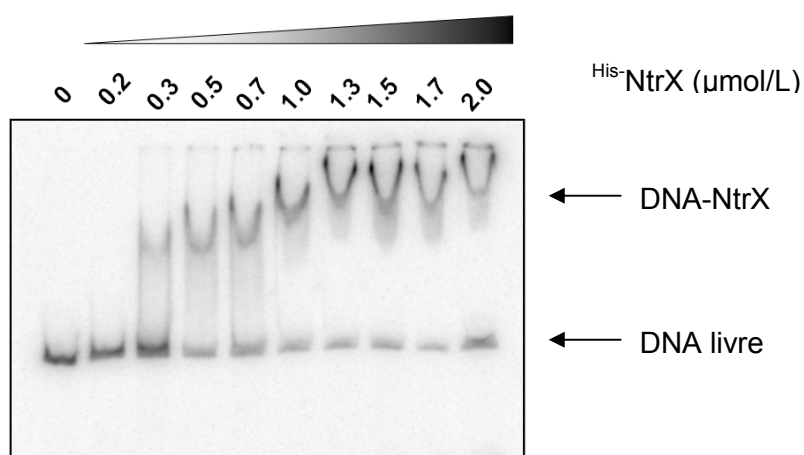
4.4.3 Ensaios *in vitro* de ligação entre a região promotora do gene *narK* e a proteína ^{His}-NtrX de *H. seropedicae*

O gene *narK* de *H. seropedicae*, que codifica para uma proteína transportadora transmembrana de nitrato/nitrito cujo transporte provavelmente é independente de ATP, está a montante dos genes que codificam as proteínas estruturais do complexo enzimático da nitrito redutase, os genes *nirBDC*.

A proteína ^{His}-NtrX também foi capaz de se ligar a região promotora de *narK*, como podemos observar na figura 22, na qual houve a formação do complexo proteína-DNA a medida que a concentração de ^{His}-NtrX aumentou. Este complexo é específico, uma vez que a adição de concentrações crescentes de DNA de timo bovino não interferiram na interação proteína-DNA (Figura 23).

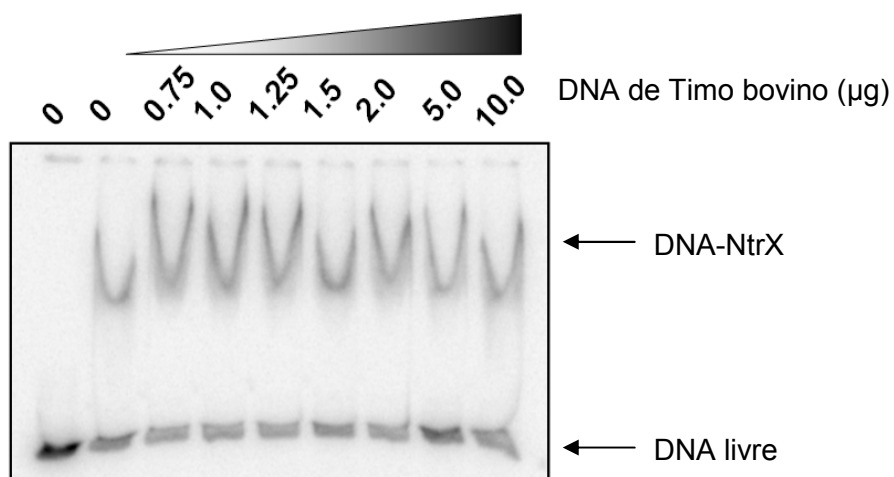
E na presença de DNA homólogo não marcado, houve um deslocamento de equilíbrio do DNA marcado pelo não marcado (Figura 24). A proteína fosforilada (^{His}-NtrX~P) é capaz de se ligar a região promotora de *narK* a partir da concentração de 0,2 µmol/L de ^{His}-NtrX~P (Figura 25).

Figura 22 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *narK*



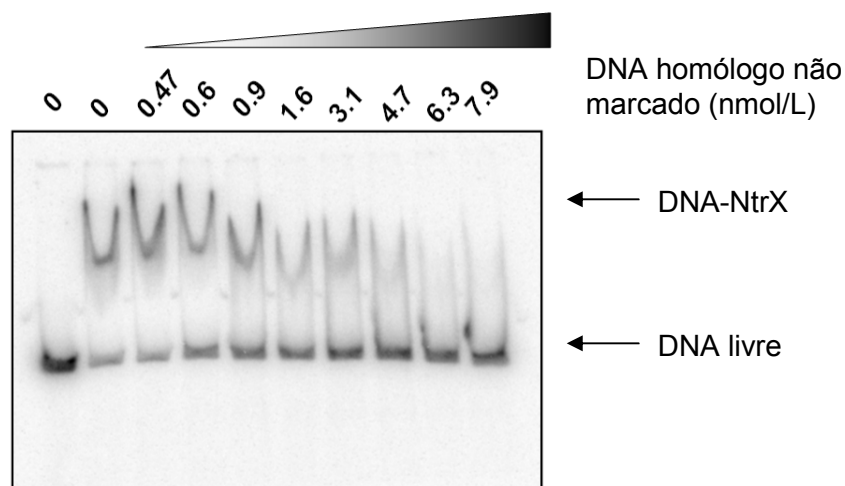
Concentrações crescentes de ^{His}-NtrX foram incubadas com o fragmento de 332 pb, correspondente a região promotora do gene *narK* marcada com [γ ³²P] ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7). Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narK* marcado radioativamente; Linhas 2-10: promotor *narK* com concentrações crescentes da proteína ^{His}-NtrX. As amostras foram analisadas em gel de poliácridamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

Figura 23 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{His}-NtrX A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *narK* DE *H. seropedicae*, NA PRESENÇA DE DNA DE TIMO BOVINO



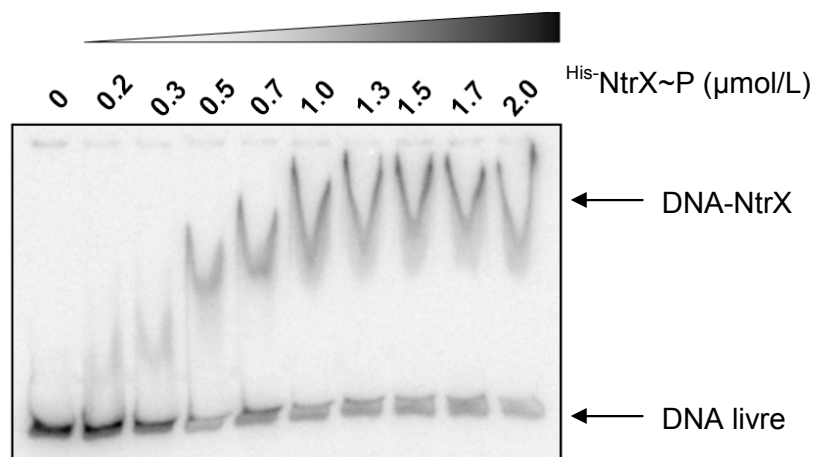
O fragmento de 332 pb, correspondente a região promotora do gene *narK* marcada com [γ ³²P] ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7) foi incubado com 1,5 µmol/L de ^{His}-NtrX e concentrações crescentes de DNA de Timo bovino. Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narK* marcado radioativamente; Linha 2: promotor *narK* com 1,5 µmol/L de ^{His}-NtrX; Linhas 3-9: promotor *narK* com 1,5 µmol/L de ^{His}-NtrX e concentrações crescentes de DNA de Timo bovino. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

Figura 24 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DE ^{32}P -NtrX A REGIÃO PROMOTORA DE *narK*, NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA HOMÓLOGO NÃO MARCADO



O fragmento de 332 pb, correspondente a região promotora do gene *narK* marcada com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7) foi incubado com 1,5 $\mu\text{mol/L}$ de ^{32}P -NtrX e concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado radioativamente. Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narK* marcado radioativamente; Linha 2: promotor *narK* com 1,5 $\mu\text{mol/L}$ de ^{32}P -NtrX; Linhas 3-10: promotor *narK* com 1,5 $\mu\text{mol/L}$ de ^{32}P -NtrX e concentrações crescentes de DNA homólogo não marcado. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

Figura 25 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA ^{35}S -NtrX FOSFORILADA COM CARBAMOIL FOSFATO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *narK*



Concentrações crescentes de ^{35}S -NtrX fosforilada com Carbamoil Fosfato (^{35}S -NtrX~P), conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8), foram incubadas com o fragmento de 332 pb, correspondente a região promotora do gene *narK* marcada com $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.4.7). Linha 1: fragmento de DNA contendo a região promotora do gene *narK* marcado radioativamente; Linhas 2-10: promotor *narK* com concentrações crescentes da proteína ^{35}S -NtrX~P. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida não desnaturante 4,5% conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7).

5 DISCUSSÃO

A proteína NtrX é uma proteína reguladora de resposta que em *H. seropedicae* é responsável pela regulação dos genes envolvidos no metabolismo de nitrato (ALVES, 2006). Análises da sequência de aminoácidos de NtrX demonstraram que a proteína possui o aminoácido aspartato no domínio regulador de resposta, o qual é conservado dentre as proteínas NtrX de outros organismos. Este aminoácido é responsável pela ativação da proteína através da sua fosforilação. A proteína NtrX de *H. seropedicae* e de outros organismos pertencentes a classe das β -proteobactérias, não possuem a região central com o domínio AAA⁺, responsável pela atividade ATPase associada a atividades celulares, porém apresentam em sua região C-terminal o domínio HTH responsável pela ligação ao DNA.

Em *A. brasilense* a proteína NtrX ao receber o grupamento fosfato do seu par sensor NtrY, sofre uma mudança conformacional expondo os domínios AAA⁺ e hélice-volta-hélice de ligação ao DNA. NtrX se liga ao DNA e interage com a RNA polimerase holoenzima, para catalisar a formação do complexo aberto através da energia da hidrólise do ATP, levando ao início da transcrição (ASSUMPÇÃO, 2002).

Já em *H. seropedicae* a ativação transcricional por NtrX provavelmente é diferente do que ocorre em *A. brasilense*, uma vez que a proteína de *H. seropedicae* possui apenas dois domínios, não apresentando o domínio AAA⁺. A ligação ao DNA pela NtrX provavelmente é similar a proteína NarL, que também possui apenas dois domínios, o regulador de resposta e o de ligação ao DNA. A proteína NarL ao se ligar ao DNA causa uma mudança conformacional no DNA da forma B para A, levando a formação de complexo aberto juntamente com outros fatores para que ocorra a transcrição (MARIS et al., 2002).

Ensaio de interação proteína-proteína com ^{His}-NtrX de *H. seropedicae*, utilizando glutaraldeído, demonstraram que há presença de formas diméricas e monoméricas da ^{His}-NtrX em solução. A formação de oligômeros é comum entre as proteínas regulatórias de resposta, como por exemplo, as proteínas PhoP de *Salmonella enterica* e NtrC de *E. coli* que formam dímeros ativos, independentemente de fosforilação, capazes de ligarem ao DNA, de maneira

que a proteína reguladora de resposta ^{His}-NtrX de *H. seropedicae* se assemelha a essas proteínas quanto a característica de formar dímeros mesmo sem estar fosforilada (YANG, et al. 2004; PERRON-SAVARD, CRESCENZO e LE MOUAL, 2005).

A proteína ^{His}-NtrX de *H. seropedicae* é capaz de se ligar a região promotora dos operons *narXL*, *narK1KGHJInasA* e *narKnirBDC* de forma específica, uma vez que concentrações crescentes de DNA de timo bovino não interferiram na formação do complexo DNA-proteína. A formação deste complexo DNA-proteína é independente de fosforilação da ^{His}-NtrX, o que ocorre também com a proteína NtrC de *H. seropedicae*, a qual é capaz de se ligar a região promotora do gene *glnA* independentemente de fosforilação (TWERDOCHLIB et al., 2003).

A proteína ^{His}-NtrX pode catalisar a sua própria fosforilação, como ocorre com outras proteínas reguladoras de resposta, por exemplo, CheY de *E. coli* que se auto fosforila utilizando como fosfodoador o composto químico carbamoil fosfato (LUKAT et al., 1992).

Ensaio de interação proteína-DNA demonstraram que ^{His}-NtrX quando fosforilada apresenta uma maior afinidade pelo DNA quando comparado com a proteína não fosforilada, no entanto esta afinidade não pôde ser quantificada. Este aumento da afinidade da proteína fosforilada pelo DNA, foi demonstrado também entre a proteína OmpR~P e os sítios regulatórios *ompF* e *ompC* em *E. coli*, que houve um aumento de afinidade em torno de 10 vezes (HEAD, TARDY e KENNEY, 1998).

A capacidade da proteína ^{His}-NtrX não fosforilada de se ligar ao DNA, indica que o domínio HTH provavelmente está exposto, possibilitando a ligação ao DNA. A sua fosforilação leva a uma mudança conformacional da proteína deixando mais exposto o domínio efetor (HTH) aumentando a afinidade da proteína ^{His}-NtrX~P pelo DNA.

A formação do complexo DNA-proteína entre ^{His}-NtrX e as regiões promotoras dos operons *narXL*, *narK1* e *narKnirBDCnasA*, juntamente com os dados obtidos por Alves (2006), que observou uma redução da expressão das fusões das regiões promotoras de *narX::lacZ* e *narK::lacZ* foram reduzidas quando na estirpe mutante *ntrY* de *H. seropedicae*, sugerem que a proteína

reguladora de resposta NtrX está envolvida na regulação da expressão de *narXL*, *narK1* e de *narKnirBDCnasA* em *H. seropedicae*.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A expressão da proteína recombinante ^{His}-NtrX a 20°C utilizando 0,5 mmol/L de IPTG aumentou a solubilidade da proteína de 6% e 4% para 47% e as modificações no processo de purificação aumentou a pureza da proteína para 94%.
- ✓ A proteína ^{His}-NtrX de *H. seropedicae* quando em solução, encontra-se na forma monomérica e dimérica;
- ✓ A proteína ^{His}-NtrX é capaz de ligar especificamente às regiões promotoras dos operons *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1KGHJI* sendo essas ligações independentes de fosforilação;
- ✓ Quando fosforilada com carbamoil fosfato a proteína ^{His}-NtrX, apresentou um aumento da afinidade pelas regiões promotoras dos operons *narXL*, *narKnirBDC* e *narK1KGHJI*.
- ✓ A proteína NtrX de *H. seropedicae* é capaz de regular a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de nitrato e nitrito neste organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. R., **Caracterização dos genes *nrY* e *nrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. 50p Dissertação (Monografia/Especialização em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ALVES, L. R. **Análise funcional dos genes *nrY* e *nrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. 80p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Departamento de Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ASSUMPÇÃO, M.C. **Contribuição para o entendimento da função do operon *nrYX* de *Azospirillum brasilense***. 81p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Departamento de Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

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

BALDANI, J.L.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. Nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, n.1, p.7-11, 1998.

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

BURRIS, R.H. Nitrogenases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, n. 15 p. 9339-9342, 1991.

COLE, J. Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation?. **FEMS Microbiology Letters**. v. 136. p. 1-11, 1996.

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

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Appl. Environ. Microbiol.** V.67, n.5, p.2375-2379, 2001.

DARWIN, A.J.; STEWART, V. Expression of the *narX*, *narL*, *narP* and *narQ* genes of *Escherichia coli* K-12: regulation of the regulators. **J. Bacteriol.** V.177, n.13, p. 3865-3869, 1995.

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

EADY, R.R. The Mo⁻, V⁻ and Fe⁻, Based nitrogenase system of *Azotobacter*. **Adv. In Inorg. Chem.**, San Diego, v. 36, p. 77-102, 1991.

ESPIN, G.; ALVAREZ-MORALEZ, A.; CANNON, F.; DIXON, R.; MERRICK, M.J. Cloning of the *glnA*, *ntrB* e *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. **Molecular and General Genetics**. V. 186, p. 518-524, 1982.

FISCHER, H-M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. **Microbiological Reviews**, v. 58, p. 352-386, 1994.

FOUSSARD, M.; CABANTOUS, S.; PÉDELACQ, J-D.; GUILLERT, V.; TRANIER, S.; MOUREY, L.; BIRCK, C.; SAMAMA, J-P. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. **Microbes and Infection**, v. 3, n.5, p. 417-424, 2001.

GALPERIN, M. Y. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. **Environ Microbiol**, v. 6, p. 552-567, 2004.

GAVIRA, M.; ROLDÁN, M.D.; CASTILLO, F.; MORENO-VIVIÁN, C. Regulation of *nap* gene expression and periplasmic nitrate reductase activity in the phototropic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DMS158. **J. Bacteriol.** V. 184, p. 1693-1702, 2002.

GEORGIADIS, M. M.; KOMIYAH, H.; CHAKRABARTI, P.; WOO, D.; KORNUC, J.J.; REES, D.C. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Science**, Washington, v. 257, p. 1653-1659, 1992.

GREGOR, J. **Identifizierung von Interaktionspartnern des response Regulators RegA aus *Rhodobacter capsulatus***. 182p. Dissertação (Doutorado) Fachbereich: FB 08 Biologie und Chemie. Institut: Institut für Mikro- und Molekularbiologie, Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften - Justus-Liebig-Universität Giessen, 2002.

GREGOR, J.; ZELLER, T.; BALZER, A.; HABERZETTL, K.; KLUG, G. Bacterial regulatory networks include direct contact of response regulator proteins: interaction of RegA and NtrX in *Rhodobacter capsulatus*. **J. Mol. Microbiology and Biotechnol.**, v.13, p. 126-139, 2007.

HEAD, C.G.; TARDY, A.; KENNEY, L.J. Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the *ompF* and *ompC* regulatory sites. **J. Mol. Biol.**, v.281, p. 857-870, 1998.

HOWARD, J. B.; DAVIS, R.; MOLDENHAUER, B.; CASH, V. L.; DEAN, D. Fe-S cluster ligands are the only cytein required for nitrogenase Fe-protein activities. **L. biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, n.19, 1989.

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

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.**, Washington, v. 85, p. 4976-4980, 1988.

KIERNAN, J.A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What are and what they do? **Microscopy Today** p. 8-12, 2000.

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

KLASSEN, G; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. **Can. J. Microbiol** , n. 43, p. 841–846, 1997.

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

KRANZ, R.G.; PACE, V.M.; CALDICOTT, I.M. Inactivation, sequence, and *lacZ* fusion analysis of a regulatory locus required for repression of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**. V. 172, p. 53-62, 1990.

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

LIN, J.T.; GOLDMAN, S.; STEWART, V. The *nasFEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. **J. Bacteriol.** V.176, p. 2551-2559, 1994.

LUKAT, G.S.; McCLEARY, W.R.; STOCK, A.M. STOCK, F.B. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. **Proc. Natl. Acad. USA**, v.89, p. 718-722, 1992.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.T. The nitrate-nitrite- nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature reviews drug discovery**. V. 7, p. 156-167, 2008.

MacGREGOR, C.H.; SCHNAITMAN, C.A.; NORMANSELL, D.E. Purification and Properties of nitrate reductase from *Escherichia coli* K12. **The J. Biol. Chem.** V. 249, no.16, p. 5321-5327, 1974.

MARGER, M.D.; SAIER, M.H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. **Trends Biochem. Sci.** V.18, p.13-20, 1993.

MARIS, A.E.; SAWAYA, M.R.; KACZOR-GRZESKOWIAK, M.; JARVIS, M.R.; BEARSON, S.M.D.; KOPKA, M.L.; SCHRÖDER, I.; GUNSALUS, R.P. Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. **Nature structural biology**. V.9,no.10, p.771-778, 2002.

MERRICK, M.J. Nitrogen control of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. **Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria**, Chapter 9, p. 197-223, 2004.

MERRICK, M.J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. **The EMBO Journal**, v.2, p. 39-49, 1983.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., p. 325-355, 1990.

MOIR, J.W.B.; WOOD, N.J. Nitrate and nitrite transport in bacteria. **CMLS Cell. Mol. Life Sci.** , v. 58, p. 215-224, 2001.

MORENO-VIVIÁN, C.; CABELLO, P.; MARTEÍNEZ-LUQUE, M.; BLASCO, F.; CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **J. Bacteriol.**, v.181, no. 21, p.6573-6584, 1999.

NAKANO, .M.M; HOFFMANN, T.; ZHU, Y.; JAHN, D. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* *nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. **J. Bacteriol.** V. 180, p. 5344-5350, 1998.

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

NOJI, S.; NIHNO, T.; SAITO, T.; TANIGUSHI, S. The *nark* gene product participates in nitrate transport induced in *Escherichia coli* nitrate-respiring cells. **FEBS Letters**, v. 252, p. 139-143, 1989.

OGAWA, K.; AKAGAWA,E.; YAMANE, K.; SUN, Z.W.; LaCELLE, M.; ZUBER, P. The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** V. 180, p. 1409-1413, 1995.

OSAKI, J.H. **Expressão e purificação da proteína NtrX de *Herbaspirillum seropedicae***. 32p. Dissertação (Monografia/Especialização em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PAO, G.M.; SAIER, M.H. Jr. Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. **J.Mol.Evol.**,v.40, p.136-154, 1995.

PAWLOWSKI, K.; KLOSE, U.; BRUIJN, F.J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **Molecular and General Genetics**, v.231, p.124-138, 1991.

PAWLOWSKI, K.; RATET, P.; SCHELL, J.; BRUIJN, J. de Cloning and characterization of *nifA* and *ntrC* genes of the stem nodulation bacterium ORS571, the nitrogen fixing symbiont of *Sesbania rostrata*: regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes in the free-living versus symbiotic state. **Molecular and General Genetics**, v.206, p.207-219,1987.

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

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr(gln)* type gene products. **FEMS Microbiology Lettrs**, v.23, p. 95-101,1984.

PEDROSA, F.O. Sequenciada bactéria que produz "adubo natural" Genoma mapeado por cientistas paranaenses trará economia de milhões para a agricultura brasileira. **Ciência Hoje On-line**. Disponível em:<<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/3234>>, 2005

PERRON-SAVARD, P.; DE CRESCENZO, G.; LE MOUAL, H. Dimerization and DNA binding of the *Salmonella enterica* PhoP response regulator are phosphorylation independent. **Microbiology**, v. 151, p. 3979-3987, 2005.

PERSUHN, D.C.; SOUZA,E.M.; STEFFENS, M.B.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and

activity of glutamine syntetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Lettrs**, v.192, p. 217-221, 2000.

PHILIPPOT, L.; HØJBERG, O. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. **Biochimica et biophysica acta**, v.1446, p. 1-23, 1999.

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

RABIN, R. S.; STEWART, V. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX e NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v.175, p. 3259-3268, 1993.

REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Isolation of the nitrogen assimilation regulator, NRI, the product of the *glnG* gene of *E. coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 80, p. 5554-5558, 1983.

REYES, F.; GAVIRA, M.; CASTILLO, F.; MORENO-VIVIÁN, C. Periplasmic nitrate-reducing system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: transcriptional and mutational analysis of the *napKEFDABC* gene cluster. **Biochem.J.** v. 331, p.897-904, 1998.

RICHARDSON, D.J.; BERKS, B.C.; RUSSELL, D.A.; SPIRO, S.; TAYLOR, C.J. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci**, v.58, p. 165-178, 2001.

RUBIO, L.M.; HERRERO, A.; FLORES, E. A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. **Plant Mol.** V.30, p. 845-850, 1996.

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.

SATOH, T. Soluble dissimilatory nitrate reductase containing cytochrome c from a photodenitrifier, *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. **Plant. cell. Physiol.** V. 22, p. 443-452, 1981.

SCHREIBER, K.; KRIEGER, R.; BENKERT, B.; ESCHBACH, M.; ARAI, H.; SCHOBERT, M.; JAHN, D. The anaerobic regulatory network required for

Pseudomonas aeruginosa nitrate respiration. **J. Bacteriol.** v. 189, no. 11, p. 4310-4314, 2007.

SCHRÖDER, I.; WOLIN, C.D.; CAVICHIOLI, R.; GUNSALUS, R.P. Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the Nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 176, no. 16, p. 4985-4992, 1994.

SHARMA, V.; NORIEGA, C. E.; ROWE, J. J. Involvement of NarK₁ and NarK₂ proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **APPL. Environ. Microbiol.** v. 72, no. 1, p. 659-701, 2006.

SODERGREN, E.J.; HSU, P.; DeMOSS, J.A. Roles of the *narJ* and *narI* gene products in the expression of nitrate reductase in *Escherichia coli*. **The J. Biol. Chem.** V.263, no. 31, p. 16156-16162, 1988.

SOHASKEY, C.D.; WAYNE, L.G. Role of *narK2X* and *narGHJI* in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.** v.185, no. 24, p. 7247-7256, 2003.

STEWAT, V.; LU, Y.; DARWIN A.J. Periplasmic nitrate reductase (Nap ABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** v.184, p. 1314-1323, 2002.

STEWAT, V.; PARALES, J. Identification and expression of genes *narL* and *narX* the *nar* (Nitrate Reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** v. 170, no.4, p. 1589-1597, 1988.

STEWART, V.; PARALES, J.; MERKEL, J.R.; MERKEL, S. M. Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (Nitrate Reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** v. 171, no.4, p. 2229-2234, 1989.

STOCK, J.B.; NINFA, A.J.; STOCK, A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. **Microbiological Reviews**, v.53 p.450-490, 1989.

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

TEIXEIRA, K.R. dos S., Bases moleculares e genéticas da fixação de nitrogênio. Seropédica: **Embrapa-CNPAB**, 1997. 26p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, V32).

TEIXEIRA, K.R. dos S., O mecanismo de regulação da FBN e sua diversidade. Seropédica: **Embrapa-CNPAB**, 1997. 25p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, V40).

TWERDOCHLIB, A. L. **Expressão e caracterização da proteína NtrC de *Herbaspirillum seropedicae***. 124 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

TWERDOCHLIB, A.L.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M; PEDROSA,F.O.; STEFFENS, M.B.R.; YATES,G.; RIGO,L.U. Expression, purification, and DNA-binding activity of the solubilized NtrC protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v.30, p. 117-123, 2003.

ZAHRAN, H.H. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 63,n.4, p. 986-989, 1999.

ZUMFT, W.G. Cell Biology and molecular basis of denitrification. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.61, no. 4, p. 533-616, 1997.

WEST, A. H.; STOCK, A. M. Histidine Kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. **TRENDS in Biochemical Sciences**. v.26, p. 369-376, 2001.

WILSON, R.L.; LIBBY, S.J.; FREET, A.M.; BODDICKER, J.D.; FAHLEN, T.F.; JONES, B.D. Fis a DNA nucleotide-associated protein, is involved in *Salmonella typhimurium* SPI-1 invasion gene expression. **Mol. Microbiol**, v.39, p.79-88, 2001.

