

JULIANA INABA

**EFEITO DE MUTAÇÕES NAS PROTEÍNAS GlnB E GlnZ SOBRE A
REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM
*Azospirillum brasilense***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Giseli Klassen

CURITIBA

2005

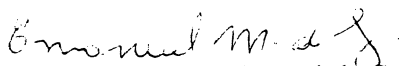
TERMO DE APROVAÇÃO

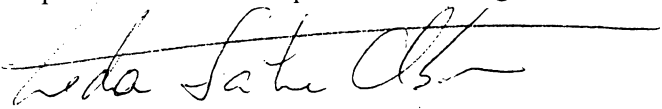
JULIANA INABA

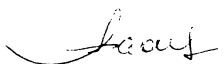
EFEITO DE MUTAÇÕES NAS PROTEÍNAS GlnB E GlnZ SOBRE REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *Azospirillum brasilense*


Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências- Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:


Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular


Prof.^a. Dr.^a. Leda Satie Chubatsu
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular


Prof.^a. Dr.^a. Cyntia Fadel Picheth
Departamento de Patologia Médica


Prof.^a. Dr.^a. Rose Adele Monteiro
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Curitiba, 29 de abril de 2005.

Orientadores: Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Dra. Giseli Klassen

Às crianças no parque

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Bioquímica e Biologia Molecular pela confiança depositada e por permitir que o meu trabalho fizesse parte da história deste Departamento. Agradeço ao CNPq, CAPES, programa PRONEX e FUNPAR pelo suporte financeiro.

Agradeço imensamente aos meus orientadores Dr. Emanuel Maltempo de Souza e Dra. Giseli Klassen que de maneiras singulares me deram apoio, discussões, puxões de orelhas, conselhos, risos, choros. Agradeço pela formação profissional, mas principalmente pelo meu crescimento pessoal. Agradeço a todos os professores do grupo, Liu Un Rigo, Maria Berenice Steffens, Marshall Geoffrey Yates, Leda Satie Chubatsu, Roseli Wassem, Leonardo Cruz, Rose Adele Monteiro, Cyntia Picheth e Elaine Benelli..

Aos professores Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Dra. Glaci Zancan pelos exemplos de eficiência e dedicação à pesquisa.

Aos queridos amigos LÍlian, Mariana, Luíza, Jú Ramos, Fabiane, Rose Adele, pelo imenso auxílio, discussões, risadas, companhia que fazem do trabalho uma alegria. Agradeço especialmente ao Luciano Huergo, querido amigo, que contribuiu substancialmente para a realização deste projeto e com o meu desenvolvimento científico.

Aos amigos, fixos e flutuantes, do “complexo habitacional” 275/279: Rafael, Michelle, Cyntia, Geraldo, Adriana, Humberto e, especialmente, Carolina, Andréa Tarzia, Gustavo, Ana Cláudia, Marcelo, Magda, pela alegria, amizade, momentos de descontração e de concentração. Ao meu “no-milko” André, pelo “incentivo ao esporte”, amizade e por ser o responsável por tantas gargalhadas nesses últimos anos. À grande amiga Elaine por me dar apoio em tantos momentos difíceis e me fazer perceber que nada dá errado para quem não está só.

Aos companheiros de luta: Diogo, Lauro, Graci, Gerusa, Ana Helena, Marcelo, Gustavo e à querida amiga Giovana, pelos duros e leves momentos compartilhados nessa jornada. Às minhas grandes e maravilhosas amigas Patrícia e Tatiana, companheiras de tantos

anos, por me darem esperança, força, alegria, fé, palavras doces, palavras duras... Enfim, Deus sabe o quanto sou grata por ter amigas como vocês!

Agradeço a todos os amigos do laboratório: Bicudinho, Eliel, Helisson, Flor-de Lys, Karen, Dani, Maria Lúcia, Lauren, Adriana I., Augusto, Giovani, Juliana, André, Fernanda, Tuca, Marcos, Mi, Jules, Thiago, pelo agradável convívio e amizade.

Agradeço imensamente à Raisinha, Igor, Chuchu e especialmente à Tatá e Nathasha por fazerem de uma experiência tão dura uma imensa alegria. E olha que foram tantos meses!!! Amo muito vocês.

Aos meus pais e a minha amiga-irmã Carol pelo incentivo, carinhas compreensivas, amor e união. A minha linda Tchutchu por ser de cachorro à amiga. A minha mãe, Vera Lúcia, por chegar a correr mesmo sem poder andar. Sua força me mostra o quanto a vida é fácil para quem tem coragem.

À família Lacerda pelo abrigo, conversas, apoio e incentivo. Ao meu querido Vina, pelo amor, compreensão, ensinamentos, alegrias, colos e por dar tantas cores à minha vida.

Enfim, agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Ao Valter, Dona Jú e Rose Prado, por serem símbolos tão fortes de alegria, dedicação e eficiência para todos. Muito obrigado por tudo. E a você Deus, o mínimo que posso fazer é te agradecer por nos ter dado o melhor objeto de estudo: a vida.!!!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O CICLO DO NITROGÊNIO.....	1
1.2 O USO DE FERTILIZANTES NITROGENADOS.....	3
1.3 <i>Azospirillum. brasilense</i>	5
1.3.1 Mecanismos de Assimilação de Nitrogênio.....	6
1.3.1.1 Captação de Amônio.....	7
1.3.1.2 Fixação de Nitrogênio.....	8
1.3.1.3 Assimilação de Amônio.....	10
1.3.2 As proteínas da Família PII.....	12
1.3.3 O Sistema Ntr e o Controle Transcricional do Metabolismo de Nitrogênio.....	14
1.3.4 Regulação da Fixação de Nitrogênio.....	22
1.3.5 Integração dos Sinais de Nitrogênio Intracelular Fixado, Disponibilidade de Carbono e Energia pelas Proteínas PII.....	23
1.3.6 PII e seu Controle no Metabolismo de Nitrogênio em Outros Organismos.....	25
1.3.7 Regulação Pós-Traducional da Atividade de Nitrogenase.....	26
1.3.8 Participação das Proteínas PII na Regulação do Sistema de Transporte.....	31
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL:.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	33
3.1 ESTIRPES E PLASMÍDEOS.....	33
3.2 REAGENTES.....	34
3.3 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	35
3.4 ANTIBIÓTICOS.....	37
3.5 MANIPULAÇÃO GÊNICA.....	38
3.6 MUTAGÊNESE ALEATÓRIA DOS GENES <i>glnB</i> E <i>glnZ</i> DE <i>A. brasilense</i>	38
3.7 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DOS GENES <i>glnB</i> E <i>glnZ</i> DE <i>A. brasilense</i>	39

3.8	SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	43
3.9	SUBCLONAGEM DOS GENES <i>glnB</i> E <i>glnZ</i> DE <i>A. brasilense</i> E SEUS MUTANTES.....	43
3.10	CONJUGAÇÃO BACTERIANA.....	46
3.11	ATIVIDADE DE NITROGENASE.....	47
3.11.1	Atividade de Nitrogenase em Meio Líquido.....	47
3.11.2	Atividade de Nitrogenase em Semi-Sólido.....	48
3.12	DETERMINAÇÃO DO DESLIGAMENTO DA NITROGENASE EM <i>A. brasilense</i>	48
3.13	DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DEPENDENTE DE NITRATO EM <i>A. brasilense</i>	49
3.14	DETERMINAÇÃO DA EXCREÇÃO DE AMÔNIO EM <i>A. brasilense</i>	49
3.15	CAPTAÇÃO DE [¹⁴ C] METILAMÔNIO EM <i>A. brasilense</i>	49
3.16	TRANSPORTE DE AMÔNIO EM <i>A. brasilense</i>	50
3.17	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	OBTENÇÃO DE FORMAS MUTANTES DOS GENES <i>glnB</i> E <i>glnZ</i> DE <i>A. brasilense</i>	51
4.1.1	Mutagênese Aleatória.....	51
4.1.2	Mutagênese Sítio Dirigida.....	53
4.2	CLONAGEM DOS GENES <i>glnB</i> , <i>glnZ</i> E SEUS MUTANTES NO VETOR pLAFR3.18.....	54
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES <i>GlnB</i> E <i>GlnZ</i> <i>A. brasilense</i>	54
4.3.1	Atividade de Nitrogenase.....	54
4.3.2	Desligamento/Religamento da Nitrogenase em <i>A. brasilense</i>	57
4.3.3	Taxa de Captação de Íons Amônio em <i>A. brasilense</i>	67
4.3.4	Taxa de Captação de Metilamônio.....	71
4.3.5	Utilização de Nitrato como Fonte de Nitrogênio.....	74
4.3.6	Excreção de NH ₄ ⁻	77
5	CONCLUSÕES.....	80
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- O CICLO BIOLÓGICO DO NITROGÊNIO.....	1
FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO VAZAMENTO-RECUPERAÇÃO DE $\text{NH}_3/\text{NH}_4^-$ NA CÉLULA BACTERIANA.....	7
FIGURA 3- PROTEÍNA ESTIMULADORA DE LIGAÇÃO.....	16
FIGURA 4- REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM <i>Azospirillum brasilense</i>	21
FIGURA 5- CURSO DA ATIVIDADE DE NITROGENASE DURANTE O “SWITCH-OFF”.....	28
FIGURA 6 - ESQUEMA PARA OBTENÇÃO DE MUTANTES SÍTIO DIRIGIDOS DOS GENES <i>glnB</i> e <i>glnZ</i> DE <i>A. brasilense</i>	42
FIGURA 7 - ESQUEMA DE CLONAGEM DOS GENES <i>glnB</i> E <i>glnZ</i> E SEUS MUTANTES NO VETOR pLAFR 3.18.....	45
FIGURA 9 - EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnB, GlnZ E SEUS MUTANTES NA ATIVIDADE DA NITROGENASE DE ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i>	56
FIGURA 10- EFEITO DA PROTEÍNA GlnZ-51 NO DESLIGAMENTO E RELIGAMENTO DA NITROGENASE POR ADIÇÃO DE ÍONS AMÔNIO EM <i>A. brasilense</i>	59
FIGURA 11- EFEITO DA PROTEÍNA GlnZ-IR NO DESLIGAMENTO E RELIGAMENTO DA NITROGENASE POR ADIÇÃO DE ÍONS AMÔNIO EM ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i>	62
FIGURA 12- ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII.....	63

FIGURA 13 - EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DE NITROGENASE EM <i>A. brasilense</i> ESTIRPE FAJ (MUTANTE <i>amtB</i>).....	71
FIGURA 14 - EFEITO DAS PROTEÍNAS GLNZ E GLNZY-51-F NO TRANSPORTE DE AMÔNIO EM ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i>	69
FIGURA 15 - EFEITO DAS PROTEÍNAS GLNB E GLNZ NO TRANSPORTE DE AMÔNIO EM ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i>	70
FIGURA 16: EFEITO DAS PROTEÍNAS GLNZ E DERIVADAS NO TRANSPORTE DE METILAMÔNIO EM <i>A. brasilense</i>	73
FIGURA 17 - EFEITO DA PROTEÍNA GLNB E SEUS MUTANTES NA EXCREÇÃO DE AMÔNIO DE ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i>	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ESTIRPES E PLASMÍDEOS.....	33
TABELA 2- ANTIBIÓTICOS.....	37
TABELA3- CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i> UTILIZANDO NITRATO COMO FONTE ÚNICA DE NITROGÊNIO.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP= 5' difosfato de adenosina

Amp^r =resistência à ampicilina

Atase= enzima adenililtransferase

ATP= 5' trifosfato de adenosina

D. O.= densidade óptica

dATP= 5' trifosfato de 2' desoxiadenina

dGTP= 5' trifosfato de 2' desoxiguanidina

DMSO= dimetilsulfóxido

DNA= ácido desoxirribonucléico

DNTPs= 5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo

DraG= dinitrogenase redutase glicohidrolase

DraT= dinitrogenase ADP-ribosil transferase

e⁻= elétron

EDTA= ácido etilenodiamino-tetra ético

g= grama

GDH= glutamato desidrogenase

GLN= glutamina

GLU= glutamato

GOGAT = glutamato sintase

GS= glutamina sintetase

ha = hectare

IP TG = β - D- isopropil-tiogalactopiranosídeo

K Ω = quilo ohms

Kb = kilobase

Km^r = resistência a canamicina

KV= quilo volts

L= litro

m/v = massa por volume

N₂ ase = nitrogenase

NAD⁺ = nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado

NADH = nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido

NADP⁺ =fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado

NADPH = fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido

Nal^r = resistência a ácido nalidíxico

NtrC-P = Proteína NtrC fosforilada

pb= pares de base

PCR= reação em cadeia da polimerase

Pi= fosfato inorgânico

PII-U MP= Proteína PII uridililada

RBS = sítio de ligação de ribossomo

rpm = rotação por minuto

SDS = dodecilsulfato de sódio

Sm^r = resistência à estreptomicina

Tc^r = resistência à tetraciclina

U = unidade enzimática

UMP = 5' monofosfato de uracila

Utase = enzima uridililtransferase

X-gal = 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

RESUMO

Azospirillum brasilense é um diazotrofo aeróbio encontrado em associação com raízes de diversas plantas de interesse comercial. Em *Azospirillum brasilense* as proteínas da família PII, GlnB e GlnZ, participam da regulação do metabolismo de nitrogênio, atuando como sinalizadoras dos níveis de amônio intracelular. Mutantes *glnB* são incapazes de fixar nitrogênio. Enquanto que mutantes *glnZ* são capazes de fixar nitrogênio. Neste trabalho, a participação destas proteínas no metabolismo de nitrogênio foi examinada utilizando estirpes mutantes de *A. brasilense* e plasmídeos expressando genes *glnB* e *glnZ* contendo mudanças de uma ou duas bases. As estirpes mutantes utilizadas foram *A. brasilense* 7628 (*glnB* negativo), 7611 (*glnZ* negativo) e 2812 (*glnBglnZ* negativo). Os derivados dos genes *glnZ* e *glnB* de *A. brasilense* obtidos foram *glnZY51-F*, *glnZI45-T,R101-C*, *glnBL13-P*; *glnBV100-A*. Os resultados obtidos revelaram que GlnB é essencial para a regulação normal de sistema Ntr, provavelmente regulando a concentração de NtrC-P, de acordo com os níveis celulares de amônio. A proteína GlnZ, por outro lado, aparentemente substituiu parcialmente GlnB no mutante 7628. Os resultados mostraram também que resíduo V100 da proteína GlnB é importante, embora não essencial, para a interação de GlnB com NtrB, uma vez que essa proteína mutante complementou parcialmente o mutante *glnB* negativo de *A. brasilense*. Entretanto, o gene mutante *glnBV100-A* não complementou o fenótipo Nif negativo do mutante 7628, sugerindo que esta forma de GlnB não interage com a proteína NifA de *A. brasilense*. O resíduo L13 é essencial para a atividade de GlnB: a sua substituição por P causa a perda da capacidade de GlnB ativar NifA e sinalizar níveis de nitrogênio para o sistema Ntr. O plasmídeo contendo o gene mutante *glnZY51-F* não foi capaz de complementar o fenótipo de reativação da nitrogenase após choque de amônio (0,2 mmol/L) e o transporte de metilamônio no mutante *glnZ* negativo 7611 de *A. brasilense*, sugerindo que a uridililação desta proteína é essencial para a sinalização dos níveis de nitrogênio intracelular no sistema DraT/DraG e para o transporte de amônio. Os resíduos I45 e R101 da proteína GlnZ, altamente conservados nas proteínas da família PII, são importantes para a transdução de sinal para o sistema DraT/DraG, mas não alteraram a capacidade de GlnZ em controlar o transporte de metilamônio em *A. brasilense*. O desligamento parcial da nitrogenase por adição de íons amônio do mutante AmtB reforça a hipótese da existência de um segundo sistema de transporte de amônio em *A. brasilense*. Os resultados desse trabalho reforçam a diferença funcional das proteínas PII de *A. brasilense* e apóiam a sugestão de que GlnB é o regulador primário da atividade do sistema de dois componentes NtrB-NtrC e que GlnZ controla o transporte de amônio de alta afinidade via AmtB. Finalmente, a análise do conjunto dos resultados implica que a concentração intracelular destas proteínas e a regulação temporal de sua síntese são elementos importantes de controle de suas atividades.

1. INTRODUÇÃO

Os principais elementos químicos presentes nos sistemas biológicos são o carbono, nitrogênio, oxigênio e o enxofre. Todos esses elementos estão sujeitos a processos cíclicos na natureza. Como exemplo, no ciclo do carbono, as plantas verdes utilizam-se da fotossíntese para converter o CO_2 da atmosfera em biomassa vegetal. Os animais, por sua vez, alimentam-se das primeiras digerindo-as e, usando os seus compostos carbonados na respiração, devolvendo carbono ao ar na forma de CO_2 . Entretanto, entre os ciclos deste quatro elementos fundamentais, o mais importante em termos ecológicos e econômicos é o ciclo do nitrogênio.

1.1 O CICLO DO NITROGÊNIO

O ciclo do nitrogênio envolve os processos de assimilação do nitrogênio, amonificação, nitrificação, desnitrificação e fixação de nitrogênio (POSTGATE, 1987) (Figura 1). A *assimilação do nitrogênio* refere-se à incorporação biológica do nitrogênio em biomoléculas a partir de compostos nitrogenados fixados.

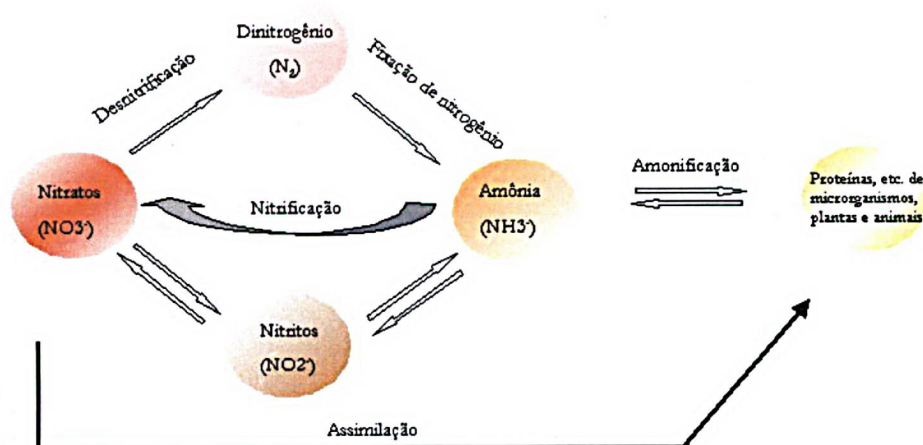


Figura 1: O ciclo biológico do nitrogênio (POSTGATE, 1987).

O termo nitrogênio fixado refere-se a qualquer composto de nitrogênio que não o N_2 , como exemplo o nitrato, nitrito, amônio, aminoácidos ou nucleotídeos.

A *amonificação* é o processo de retorno do nitrogênio presente em compostos orgânicos a amônia, um processo praticamente inverso ao da assimilação. A enzima glutamato-desidrogenase catalisa a formação de um cetó-ácido e amônia a partir de aminoácidos. A amônia também pode ser liberada a partir de aminoácidos a partir da ação de desaminases, promovendo a hidrólise de aminoácidos, e de amidas.

Na *nitrificação*, a amônia é convertida a nitrato e nitrito. Este processo ocorre amplamente no grupo das bactérias nitrificantes. Essas bactérias são organismos quimiotróficos e utilizam a energia da oxidação da amônia para fixar gás carbônico. Embora a amônia seja um nutriente utilizável pelos vegetais, o nitrato é mais eficiente e é preferido pela maioria das plantas. Desta forma, a nitrificação torna o nitrogênio mais disponível para as plantas. Entretanto, a amônia é mais retida pelo solo do que o nitrato, de forma que, a nitrificação pode resultar em perda de nitrogênio do solo. (POSTGATE, 1987).

O *processo de desnitrificação* é comum a algumas bactérias, como os gêneros *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Thiobacillus* e envolve a redução do nitrato a dinitrogênio, o qual é liberado e torna-se parte da atmosfera novamente. Esse tipo de processo gera uma perda líquida de nitrogênio fixado dos solos e das águas. Estima-se que cerca de 2×10^8 toneladas de nitrogênio são perdidas por ano como N_2 (POSTGATE, 1987).

A *fixação biológica do nitrogênio* é a capacidade de alguns organismos, denominados diazotrofos, de utilizarem diretamente o dinitrogênio atmosférico (N_2) como fonte de nitrogênio para o seu crescimento. Essa reação é dependente da atividade de nitrogenase, a qual catalisa a conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) a amônio. Essa propriedade é exclusiva a procaríotos, e ocorrem em bactérias de vida livre, simbióticas, associativas e Arquea. A fixação de nitrogênio é uma importante parte do ciclo deste elemento, pois reabastece a biosfera de nitrogênio e compensa a sua perda devido a desnitrificação (POSTGATE, 1987).

Em quase todas as áreas agriculturáveis do mundo, onde não ocorre limitação de crescimento vegetal por deficiência de luz solar ou por suprimento hídrico, a produtividade é determinada pela disponibilidade de nitrogênio inorgânico no solo. A entrada de novo nitrogênio inorgânico na biosfera pela fixação biológica de nitrogênio é o fator limitante de produtividade biológica na maioria da superfície terrestre e nas áreas marinhas. Estima-se que quantidade de nitrogênio biologicamente fixado produzido nos oceanos gira em torno de 2×10^{13} g/ano (FALKOWSKI, 1997).

1.2 O USO DE FERTILIZANTES NITROGENADOS

Nitrogênio inorgânico também pode ser obtido artificialmente e utilizado como fertilizante. O uso aumentado de fertilizantes nitrogenados químicos resulta numa interferência humana no ciclo do nitrogênio. A síntese da amônia é obtida por um processo denominado Haber-Bosch, onde ocorre a redução catalítica do nitrogênio a amônia (SHREVE, 1980). Esse processo requer uma grande quantidade de hidrogênio: cerca de 176 kg de hidrogênio são necessários para a produção de 1 tonelada de amônia (SHREVE, 1980). A reação ainda envolve o emprego de elevadas temperatura e pressão, de maneira que esses fatores contribuem para o elevado preço de produção destes fertilizantes. Além disso, a aceleração do preço da amônia decorre, sobretudo do aumento no preço do gás natural, utilizado como insumo na sua produção nos Estados Unidos e Europa (FAIRBANKS, 2004). Como os Estados Unidos são os maiores consumidores mundiais de amônia, os preços do produto normalmente seguem o preço do gás natural praticado naquele país. (FAIRBANKS, 2004).

No Brasil a produção de soja atingiu em 2004 cerca de 50 milhões de toneladas de grãos de soja no ano (IBGE). A soja é uma cultura com alta demanda pelo nitrogênio e para suprir as necessidades médias brasileiras de produtividade (2500 kg/ha), são necessários de 300 a 400 kg de N/ha (EMBRAPA). A aplicação de fertilizantes

nitrogenados para suprir essa demanda inviabilizaria economicamente a cultura no País, pois seriam necessários de 1 a 1,5 bilhões de dólares por safra para atender aos 13 milhões de hectares cultivados no Brasil (EMBRAPA). A tecnologia de utilização da simbiose entre soja e bactérias pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanhi* é em grande parte devida aos continuados trabalhos desenvolvidos desde 1960 na EMBRAPA. Hoje, bactérias deste grupo são capazes de suprir plenamente as necessidades da cultura de soja com nitrogênio fixado, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados, gerando uma grande economia para Brasil (EMBRAPA).

Além dos gastos que envolvem o emprego de fertilizantes nitrogenados às culturas, o uso destes elementos aumenta a incidência de danos ecológicos uma vez que cerca de 50% do fertilizante aplicado é perdido pela ação de chuvas, erosão e atividade bacteriana (desnitrificação) (PEDROSA, 1987). Este excesso de NO_3^- ao sofrer a desnitrificação, produz óxido nitroso. O óxido nitroso, juntamente com o dióxido de carbono produzido pela queima de carvão para a produção deste tipo de fertilizante, contribuem para o aumento do efeito estufa (PEDROSA, 1987). A contaminação de solos pelo nitrato pode causar diversos problemas ambientais: a) nitrato é tóxico para humano e animais; b) nitrato e nitrito podem ser lavados para rios, lagos e lençóis de água subterrâneos; c) o aumento de nitrogênio fixado em aquíferos induz crescimento de microrganismo, por exemplo, algas tóxicas; d) crescimento microbiano causa uma diminuição de oxigênio de rios e lagos; e) o óxido nitroso também contribui para a destruição da camada de ozônio (HABER PROCESS RESEARCH SITE). Estes fatores têm pressionado a comunidade científica mundial no sentido do desenvolvimento de tecnologias agrícolas auto-sustentáveis, especialmente aquelas utilizando diazotrofos associados a plantas, como por exemplo, a simbiose soja-*Bradyrhizobium*.

1.3 *Azospirillum brasilense*

Azospirillum spp são bactérias associativas capazes de fixar nitrogênio em microaerobiose que foram originalmente isoladas a partir de raízes de gramíneas como milho, trigo, sorgo e arroz (TARRAND *et al.*, 1978) Diversos estudos mostraram que estas bactérias estão amplamente distribuídas, associadas a várias espécies vegetais, no interior de seus tecidos, folhas, caules e no solo (PEDROSA e DOBEREINER, 1988). Os microrganismos pertencentes a este gênero têm a capacidade de se associarem a uma variedade de espécies vegetais como gramíneas, girassol, tomateiro, tabaco, abacaxi, banana, *Setaria italica*, *Aeschynomene aspera*, *Spinacea oleracea*, *Brassica chinensis*, *Brassica rapa*, *Glycine max*, (BASHAN e HOLGUIN, 1996; WEBER *et al.*, 1997). Estudos de inoculação em trigo com estirpe selvagem de *A. brasilense* FP2 (PEDROSA e YATES, 1984) contendo um plasmídeo com duplo sistema de marcação (GFP/GUS) demonstraram a presença de agregados celulares e bactérias isoladas na superfície da nova zona radicular, pêlos radiculares e raízes laterais (RAMOS *et al.*, 2002). Várias células foram evidenciadas nos pontos de emergência das raízes laterais e nos espaços intercelulares das células epidérmicas da raiz após 30 dias de inoculação (RAMOS *et al.*, 2002).

A interação *Azospirillum*-planta pode trazer mútuos benefícios. Sob certas condições ambientais, *Azospirillum* pode influenciar positivamente o crescimento de plantas, a produtividade e a quantidade de nitrogênio da planta. Esse efeito estimulatório promovido pela associação *Azospirillum*-planta têm sido atribuído a uma série de mecanismos, incluindo a fixação biológica do nitrogênio (PATRIQUIM *et al.*, 1983; BODDEY *et al.*, 1996). Um outro fator importante de promoção do crescimento da planta é a produção de substâncias promotoras do crescimento da planta como os fitormônios (giberelinas, auxinas, citocininas) produzidos por *A. brasilense* (BARBIERI *et al.*, 1986, OKON *et al.*, 1988, BASHAN *et al.*, 1989 e FAGES *et al.*, 1994). Essas substâncias promovem o aumento do número e do tamanho dos pêlos absorventes das raízes, de raízes

laterais, resultando em aumento do volume e superfície radicular (OKON et al, 1994; LIN et al, 1983, revisado por STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Como consequência, as plantas inoculadas têm maior capacidade de absorção de água e nutrientes que leva a um crescimento vegetal mais rápido.

A assimilação de fontes de nitrogênio é fundamental para a manutenção da matéria viva, uma vez que o elemento nitrogênio é necessário para a produção de aminoácidos, nucleotídeos, amino-açúcares, NAD e outras biomoléculas. Portanto, as bactérias desenvolveram uma grande variedade de mecanismos para a assimilação de diversas fontes ambientais deste elemento, que variam de amônio a dinitrogênio atmosférico (REITZER et al., 1996).

A glutamina e o glutamato são os principais doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas e podem ser assimilados diretamente pelas bactérias. O processamento destes substratos envolve menos gasto energético do que o processamento do amônio, o que os torna as fontes preferidas de nitrogênio nas bactérias. A utilização de outras fontes orgânicas como aminoácidos requer, em geral, primeiramente sua degradação a amônio. A utilização de fontes inorgânicas de nitrogênio, como NO_3^- , NO_2^- e N_2 requerem sua redução para que ocorra sua assimilação (REITZER et al., 1996).

Azospirillum apresenta três mecanismos descritos para a utilização de fontes nitrogenadas do ambiente: o processo de captação de amônio, o processo de fixação de nitrogênio e a assimilação de amônio do meio. Esses mecanismos serão apresentados a seguir.

1.3.1 Mecanismos de Assimilação de Nitrogênio

1.3.1.1 Captação de amônio

A *A. brasilense* apresenta um sistema de captação de amônio/metilamônio dependente de energia. A proteína AmtB, transportadora desse sistema, apresenta uma

afinidade de $50\mu\text{M}$ (K_m) por metilamônio (análogo radioativo de amônio) que é competitivamente inibida por amônio ($K_i = 5\mu\text{M}$) (HARTMANN e KLEINER, 1982). São atribuídas a esse transportador as funções de captação de traços de amônio em concentrações muito baixas e recaptção de pequenas quantidades de amônio que escapam da célula por difusão através da membrana (WOOD et al., 1998). Geralmente, o interior celular é mais alcalino do que a meio externo, fazendo com que ocorra depleção de íons amônio intracelular (Figura 2) (WOOD et al., 1998).

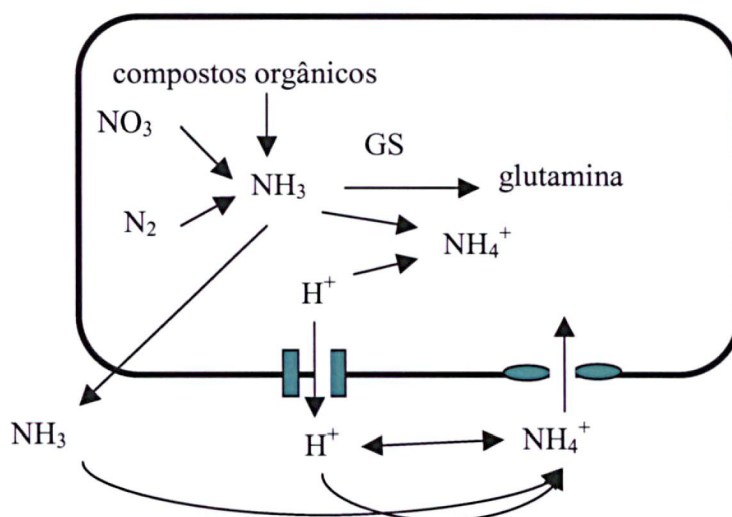


Figura 2: Representação esquemática do ciclo vazamento-recuperação de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ na célula bacteriana (adaptado de Vande Broek et al., 2000).

O gene *amtB* de *A. brasilense* codifica para o transportador de amônio AmtB e tem sua transcrição dependente do fator σ^{54} , produto do gene *rpoN* e do sistema de dois componentes regulatório de nitrogênio (sistema Ntr), NtrB/NtrC (VAN DOMMELEN et al., 1998) A proteína AmtB apresenta 12 domínios transmembrana, estrutura típica de carreadores de membrana (MARINE & ANDRÉ, 2000; THOMAS et al 2000b; VAN DOMMELEN et al., 1998). Mutantes *amtB*⁻ são incapazes de captar metilamônio e de

crecerem em baixas concentrações de amônio. Foi observado que esses mutantes não perdem a capacidade de captar amônio quando presente em altas concentrações, indicando a provável existência de um segundo sistema de transporte de amônio (VAN DOMMELEN et al., 1998). De modo diferente das enterobactérias, o gene *amtB* de *A. brasilense* não forma um operon com os genes *glnB* ou *glnZ* que codificam para as proteínas GlnB e GlnZ, respectivamente, proteínas sinalizadoras dos níveis de nitrogênio neste organismo (VAN DOMMELEN et al., 1998; THOMAS, G. COUTTS, G. & MERRICK, M). De Zamaroczy e colaboradores (1998) reportaram que mutantes *glnZ* de *A. brasilense* apresentam taxa de recaptção de metilamônio duas vezes maior do que a estirpe selvagem, sugerindo que a proteína GlnZ regula negativamente o transporte de metilamônio. É provável que GlnZ atue regulando a atividade de AmtB pois, ao contrário de GlnB, a proteína GlnZ não participa do controle do sistema Ntr, responsável pela transcrição de *amtB* (DE ZAMAROCZY et al, 1998).

1.3.1.2 Fixação de nitrogênio

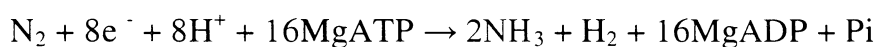
A. brasilense pode converter nitrogênio atmosférico em amônio sob microaerofilia e baixos níveis de nitrogênio pela ação da nitrogenase. O complexo da nitrogenase em *A. brasilense* é composto por duas metalo-proteínas: dinitrogenase (proteína MoFe, produto dos genes *nifDK*) e dinitrogenase redutase (proteína Fe, produto do gene *nifH*) (SCHRANK et al., 1987; FANI et al., 1989). A dinitrogenase, ou proteína FeMo, consiste de um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ e contém 4 centros metálicos de dois tipos: 2 centros P ($\text{Fe}_8\text{-S}_7$) e dois cofatores FeMo (MoFe_7S_9 -homocitrato), também conhecido como FeMoco. A dinitrogenase redutase, ou proteína Fe, consiste de um dímero γ_2 que contém um núcleo Fe_4S_4 ancorado entre as subunidades γ , cuja função é transferir elétrons de um doador para a proteína FeMo, dependente de ATP. A nitrogenase é enzima de baixa

especificidade e reduz o dinitrogênio, acetileno, ácido cianídrico, ácido hidrazóico, óxido nitroso e outros compostos com dupla ou tripla ligação (POSTGATE, 1987).

A capacidade da nitrogenase em reduzir acetileno pode ser utilizada para determinar a atividade da nitrogenase *in vitro* e *in vivo*. O método de redução do acetileno a etileno, ambos permeáveis à membrana plasmática, emprega o uso de cromatografia de fase gasosa para a detecção destes compostos (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN & BURRIS, 1967; HALBLEIB & LUDDEN, 2000).

Todos os diazotrofos estudados apresentam um sistema de nitrogenase Ferro-Molibdênio, entretanto, em condições de depleção de molibdênio, alguns organismos como *Azotobacter vinelandii* e *Rhodobacter capsulatus* sintetizam também uma ou duas nitrogenases alternativas contendo como cofator Vanádio-Ferro ou Ferro-Ferro (EADY et al., 1996). As nitrogenases contendo molibdênio, vanádio ou ferro são extremamente sensíveis ao oxigênio. Essa característica deve-se aos núcleos metálicos que funcionam como centros redox doadores de elétrons (HOWARD e REES, 1996).

A estequiometria do processo de redução do dinitrogênio é a seguinte (EADY, 1986; POSTGATE, 1987):



O mecanismo proposto envolve a redução da proteína Fe através de um doador de elétrons (como uma ferredoxina ou flavodoxina), transferência de um elétron da proteína Fe para a proteína FeMo, reação dependente de hidrólise de 1 molécula de MgATP e, finalmente, transferência interna do elétron pelo centro P até o cofator FeMo da proteína FeMo. Cada elétron transferido requer um ciclo obrigatório de associação das proteínas Fe e FeMo, formando um complexo que se dissocia após a transferência de um elétron (HAGEMAN e BURRIS et al., 1978). A formação do complexo tem papel crucial no mecanismo enzimático e é necessária para a associação da hidrólise de ATP à transferência de elétron. A taxa de dissociação da enzima define a velocidade da enzima,

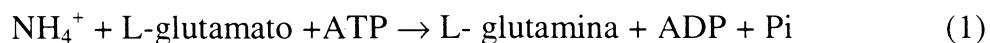
que apresenta uma taxa de *turnover* de aproximadamente 5 s^{-1} (THOMELY & LOWE., 1985).

1.3.1.3 Assimilação de amônio

Em *A. brasilense* o amônio fixado pela nitrogenase ou captado do ambiente (via transportador AmtB) pode ser assimilado por duas vias. Uma delas envolve a ação da Glutamato Desidrogenase (GDH) e funciona apenas quando a concentração de amônio é alta, dada a baixa afinidade desta enzima por NH_4^+ . A reação que ocorre neste sistema é a seguinte:



A segunda via, denominada via glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT), envolve duas reações, sendo a primeira reação catalisada pela glutamina sintetase (1), a segunda catalisada pela glutamato sintase (2) e são apresentadas abaixo (WESTBY et al., 1987) :



Essa segunda via é a via predominante de assimilação de amônio em *A. brasilense* (OKON et al., 1976).

A glutamina sintetase (GS) é codificada pelo gene *glnA* que faz parte do operon *glnBA* em *A. brasilense* (BOZOUKLIAN & ELMERICH, 1986, BOZOUKLIAN, FOGHER & ELMERICH., 1986; DE ZAMAROCZY, DELORME & ELMERICH,

1990). O gene *glnA* de *A. brasilense* pode ser expresso a partir de dois promotores, *glnBp1* e *glnBp2* localizados à montante do gene *glnB* e que são dependentes de σ^{70} ou σ^{54} , respectivamente, dependendo dos níveis de amônio intracelular. Um terceiro promotor, localizado a montante do gene *glnA*, é regulado positivamente pela presença de íons amônio e também participa do controle de expressão de GS (DE ZAMAROCZY et al., 1990 e 1993, HUERGO et al., 2003). A organização estrutural deste operon difere substancialmente do operon *glnA-ntfBC* das enterobactérias e assemelha-se à organização estrutural de *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhodobacter capsulatus*, muito embora essa semelhança estrutural não reflita semelhança regulatória (DE ZAMAROCZY et al., 1990 e 1993). Aparentemente, *glnA* é essencial para esta bactéria uma vez que não foi possível a obtenção de mutante *glnA*⁻ (BOZOUKLIAN e ELMERICH, 1986).

Em várias espécies, incluindo *E. coli*, a glutamina sintetase consiste de 12 subunidades idênticas de 55 kDa, formando um anel hexagonal (YAMASHITA, 1989). A atividade de GS é controlada pós-traducionalmente por adenililação de cada uma de suas subunidade, catalisada pela enzima Atase (ou GlnE, codificada pelo gene *glnE*) (SHAPIRO & STADTMAN, 1968; FOOR, JANSSEN & MAGASANIK, 1975). Esse processo causa a inativação progressiva da enzima em consequência do aumento dos níveis de nitrogênio intracelular. A seqüência de aminoácidos de GS e o padrão de atividade de células cultivadas em meio com diferentes concentrações de amônio sugerem que a GS de *A. brasilense* possui estrutura e sistema de regulação semelhante ao da de *E. coli*. Entretanto, ao contrário das enterobactérias, esse processo em *A. brasilense* aparentemente não é modulado pelas proteínas PII desse organismo (GlnB ou GlnZ) (DE ZAMAROCZY et al., 1993, 1996 e 1998). A enzima adenililtransferase (Atase) ainda não foi caracterizada em *A. brasilense*.

Além do dinitrogênio e amônio, outras fontes de nitrogênio podem ser utilizadas por *A. brasilense* como glutamina, glutamato, arginina, asparagina, aspartato, prolina, histidina, alanina, adenina, xantina, nitrato e nitrito. Somente a assimilação de nitrato

parece ser regulada pelo sistema regulatório de dois componentes NtrB/NtrC (VANDE BROEK et al., 2000).

1.3.2 As proteínas da Família PII

As proteínas da família PII são proteínas transdutoras de sinais muito conservadas entre os procariotos (ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK., 2001). Genes codificando para proteínas PII foram encontrados em proteobactérias, firmibactérias, cianobactérias, arquea e, recentemente, em plantas superiores (HSIEH et al., 1998). Em muitos organismos foram encontrados dois ou mais genes codificando para proteínas da família PII.

Na subdivisão α das proteobactérias já foram encontrados genes para proteínas do tipo PII em *A. brasilense* (*glnB* e *glnZ*) (DE ZAMAROCZY et al., 1993 e 1996), *Azorhizobium caulinodans* (*glnB* e *glnK*) (MICHEL-REYDELLET et al., 1997 e 1998), *Glucanoacetobacter diazotrophicus* (*glnB*, *glnK₁* e *glnK₂*) (PERLOVA et al., 2003), *Bradyrhizobium japonicum* (*glnB*) (MARTIN, THOMASHOW e CHELM, 1989), *Rhodobacter capsulatus* (*glnB* e *glnK*) (BORGUESE e WALL, 1995, DREPPER et al., 2003), *Rhodobacter sphaeroides* (*glnB* e *glnK*) (ZINCHENKO et al., 1994; QIAN e TABITA, 1998) e *Rhodospirillum rubrum* (*glnB* e *glnK*) (JOHANSSON e NORDLUND, 1996; ZHANG et al., 2001b). Em todos esses organismos, o gene *glnB* encontra-se a montante do gene *glnA*, que codifica para a glutamina sintetase. Além disso, com exceção de *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY et al., 1998) e *R. rubrum*, *glnK* apresenta-se a montante do gene que codifica para o transportador de membrana AmtB, codificado pelo gene *amtB*, indicando uma possível relação funcional entre essas proteínas (ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001; PERLOVA et al., 2003).

O resíduo Tyr-51 é altamente conservado em proteínas do tipo PII e é uridililado pela proteína GlnD, em resposta à diminuição dos níveis de amônio intracelular

(ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). A uridililação das proteínas PII foi demonstrada em *E. coli* (ATKINSON et al., 1994), *Rhizobium leguminosarum* (COLONNA-ROMANO et al., 1993), *Klebsiella pneumoniae* (EDWARDS e MERRICK., 1995), *Azospirillum brasilense* (DE ZAMAROCZY et al., 1996 e 1998), *Azotobacter vinelandii* (RUDNICK et al., 1998), *Herbaspirillum seropedicae* (BENELLI et al., 2000), *Azoarcus sp.* (MARTIN, HUREK e REINHOLD-HUREK, 2000), *Sinorhizobium meliloti* (ARCONDÉGUY et al., 1997) *Rhodospirillum rubrum* (JOHANSON e NORDLUND, 1997) e *Corynebacterium glutamicum*. (JAKOBY, KRAMER e BURKOVSKI, 1999). A remoção do grupamento UMP das proteínas PII ocorre pela atividade removedora de uridilil da proteína GlnD, em resposta a alta concentração de nitrogênio intracelular (ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001).

As proteínas da família PII são homotrímeros em solução que possui massa molecular de aproximadamente 40 KDa. Quando sintetizadas ao mesmo tempo, as proteínas PII parálogas de *E. coli* (GlnB e GlnK) podem formar heterotrímeros *in vivo*. A consequência da formação de heterotrímeros não está clara, mas aparentemente permite um ajuste fino da cascata de transdução de sinal (VAN HEESWIJK. et al, 2000). Em *E. coli*, heterotrímeros uridililados são capazes de estimular a desadenililação de GS, ativando-a, embora com menor atividade do que o homotrímero (GlnB-UMP)₃ (VAN HEESWIJK et al., 2000).

O gene *glnZ* é um parálogo de *glnB* em *A. brasilense*, mas sua função ainda não está definida (de ZAMAROCZY et al., 1996). Apesar da alta homologia entre as proteínas GlnB e GlnZ, uma proteína é incapaz de substituir a outra. Mutantes *glnB*⁻ são capazes de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio, apresentam redução da taxa de captação de íons metilamônio e são incapazes de fixar nitrogênio, indicando que a proteína GlnB é necessária para a atividade de NifA que controla a expressão dos genes envolvidos na síntese da nitrogenase (ver item 2.1.5) (ARSENE et al., 1996, DE ZAMAROCZY et al., 1998). O mutante *glnZ*⁻ de *A. brasilense* é capaz de fixar nitrogênio, apresentam um aumento de duas vezes no transportē de metilamônio, além de

apresentar deficiência na reativação da nitrogenase (*switch-on*) após adição de íons amônio às culturas desreprimidas (DE ZAMAROCZY et al., 1998, KLASSEN et al., 2001).

Tanto o gene *glnB* quanto o gene *glnZ* de *A. brasilense* apresentam promotores dependentes do fator σ^N (*glnBp2*) que são regulados por amônio e dependentes de NtrC (DE ZAMAROCZY et al., 1998 e HUERGO et al., 2003) e portanto, os produtos daqueles genes podem afetar sua própria expressão. De fato, a proteína GlnB parece regular negativamente sua própria expressão, provavelmente regulando a atividade da proteína ativadora NtrC (DE ZAMAROCZY et al., 1998, HUERGO et al., 2003). O gene *glnB* também é transcrito a partir de um promotor *glnBp1* dependente do fator σ^{70} (DE ZAMAROCZY et al., 1993).

A seguir serão detalhados o sistema de sinalização das proteínas PII e a função regulatória do sistema Ntr, na captação e assimilação de amônio, e na fixação de nitrogênio em *A. brasilense*

1.3.3 O Sistema Ntr e o Controle Transcricional do Metabolismo de Nitrogênio

Em enterobactérias e na maioria das proteobactérias a ativação de transcrição dos genes envolvidos na assimilação e catabolismo do nitrogênio é coordenado pelo sistema regulador de nitrogênio, que envolve a participação das proteínas: RpoN, NtrB, NtrC, GlnD, NifA e GlnB (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Em todas as bactérias gram-negativas fixadoras de nitrogênio a expressão dos genes *nif* requer RpoN e a proteína ativadora de transcrição NifA (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

A seguir, serão apresentadas as proteínas que fazem parte do sistema Ntr.

1.3.3.1 Fator alternativo σ^{54} da RNA polimerase

O gene *rpoN* (ou *ntrA*) codifica para um fator alternativo σ^{54} da RNA polimerase, conhecido como NtrA ou RpoN. Mutantes *rpoN*⁻ apresentam fenótipo pleiotrópico revelando o envolvimento deste fator em diversas funções celulares, incluindo a fixação de nitrogênio, assimilação de nitrato, captação de amônio e biossíntese flagelar (MILCAMPS et al., 1996).

A proteína RpoN, ou fator alternativo σ^{54} , se associa reversivelmente à RNA polimerase para reconhecer promotores com uma sequência consenso na região -12 e -24 pb, relativas ao sítio de início de transcrição (BUCK et al., 2000). O início de transcrição é dependente da interação com proteínas ativadoras de transcrição, pertencentes à família EBP (Enhancer –Binding-Proteins). A figura 3 mostra que a interação das proteínas EBP com a subunidade σ^{54} da RNA polimerase holoenzima é facilitada pela ligação de um ativador às seqüências de DNA (UAS, seqüências ativadoras à montante, geralmente localizadas a 100 pb a montante do sítio promotor). O ativador EBP ligado às seqüências UAS interagem com a RNA polimerase- σ^{54} através de uma dobra no DNA. Em alguns organismos, proteínas reguladoras, como o fator IHF, auxiliam no dobramento do DNA (BUCK et al., 2000). A interação das proteínas do EBP com a RNA polimerase leva à formação do complexo aberto através de hidrólise de nucleotídeos (DIXON e KAHN, 2004). Exemplos de proteínas ativadoras de transcrição são as proteínas NtrC e NifA.

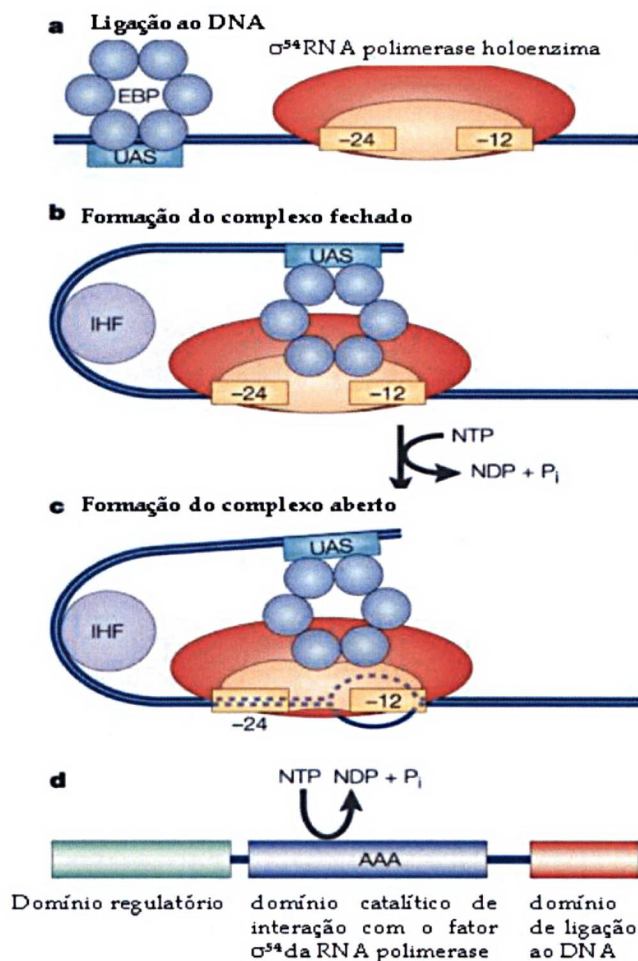


Figura 3: Proteína estimuladora de ligação (adaptado de DIXON e KAHN, 2004). Em d é apresentado os domínios característicos presentes em proteínas ativadoras de transcrição.

1.3.3.2 O sistema regulatório NtrB/NtrC

A ativação e repressão de genes regulados pelos níveis de nitrogênio e dependentes do fator σ^{54} da RNA polimerase são coordenados pela ação do sistema de dois componentes NtrB/NtrC (MERRICK, 1992). O elemento regulador de resposta, a proteína NtrC, é um ativador de transcrição de promotores dependentes de σ^{54} e faz parte da classe dos *enhancer binding proteins* (EBP) (item 1.3.3.1). Esta proteína apresenta um

domínio carbóxi-terminal de ligação ao DNA, um domínio central altamente conservado, relacionado à ativação de transcrição e um domínio N-terminal, típico de proteínas pertencentes ao sistema de dois componentes (STOCK, NINFA e STOCK, 1989; PARKINSON e KOFOID, 1992). A região N-terminal é altamente conservada, contendo um resíduo Asp-54 que pode ser fosforilado pela proteína NtrB em resposta a baixos níveis de amônio. A forma fosforilada (NtrC-P) é a forma ativa de NtrC (KERN et al., 1999; VOLKMAN et al, 1995; WEISS, CLAVERIE-MARTIN e MAGASANIK, 1992). Nessas condições, NtrC-P liga-se a uma seqüência de DNA conservada nos promotores alvo numa forma oligomérica (octâmero) e ativa a transcrição, dependente da hidrólise de nucleotídeo trifosfato. A formação de oligômeros é essencial para que se inicie a transcrição (WYMAN et al., 1997). Muitos promotores apresentam múltiplos sítios de ligação para NtrC, o que facilita a oligomerização da proteína (AUSTIN e DIXON 1992; METTKE, FIEDLER e WEISS, 1995; WEISS, CLAVERIE-MARTIN e MAGASANIK, 1992, WEISS et al.,1991 e WYMAN et al., 1997) e permite um ajuste fino da expressão destes genes.

Em *E. coli*, a proteína NtrB é um homodímero com cada subunidade de 36 kDa que contém 3 domínios distintos: o domínio N-terminal que é o domínio envolvido na transmissão de sinal, um domínio central, responsável pela dimerização da atividade fosfotransferase/fosfatase e o domínio C-terminal, que apresenta atividade de quinase, típico de proteínas histidina-quinases (NINFA, 1996; PARKINSON e KOFOID, 1992). O dímero NtrB é capaz de se transfosforilar no domínio C-terminal, no resíduo His-139 de uma subunidade após a ligação de ATP à outra subunidade (NINFA et al., 1986; NINFA e BENNETT, 1991 e NINFA et al, 1993). O grupamento fosforil é então transferido para um resíduo de aspartato da proteína NtrC, ativando-a (KEENER & KUSTO, 1988; WEISS & MAGASANIK, 1988; NINFA & BENNETT, 1991; NINFA *et al*, 1993) As evidências estruturais e fisiológicas sugerem que as proteínas NtrB e NtrC de *A. brasilense* são funcionalmente similares às de *E. coli* (MACHADO et al., 1996, LIANG et al., 1993; DE ZAMAROCZY, 1998).

1.3.3.3. A proteína ativadora NifA

A proteína NifA é ativadora de transcrição dos genes responsáveis pela síntese da nitrogenase. O modo de ativação da transcrição dos genes *nif* por NifA parece ser comum entre vários diazotrofos, incluindo *A. brasilense*, enquanto que a regulação da transcrição de *nifA* difere de um organismo para o outro (MERRICK, 1992). Todas as proteínas NifA caracterizadas apresentam estrutura típica de proteínas EBP (enhancer-binding proteins) que consiste em um domínio central ATPase, flanqueado pelos domínios N-terminal e C-terminal. A região N-terminal contém o domínio GAF que pode estar envolvido na ligação de moléculas pequenas (HO, BURDEN & HURLEY, 2000). Este domínio tem função regulatória e controla a atividade da proteína NifA em resposta a sinais celulares. Em *Azotobacter vinelandii*, o 2-cetoglutarato se liga ao domínio GAF de NifA, modulando sua atividade em resposta à NifL. Essa ligação não foi evidenciada na proteína NifA de *K. pneumoniae* (LITTLE & DIXON, 2003). Em *A. brasilense* esse domínio parece regular a atividade de NifA em resposta à concentração de nitrogênio fixado e aparentemente é o sítio de ligação de GlnB (ARSENE et al., 1996 e 1998). O domínio C-terminal consiste de um motivo hélice-volta-hélice responsável pela ligação desta proteína ao DNA.

O gene *nifA* de *A. brasilense* parece ser expresso a partir de um promotor dependente da subunidade σ^{70} da RNA polimerase (FADEL-PICHETH et al., 1999). Estudos com fusões *nifA::lacZ* mostraram que este gene é expresso constitutivamente, e seu nível de expressão é menor em altos níveis de amônio (LYANG et al., 1991 e 1992) e é independente de NtrC (LIANG et al., 1991; MACHADO et al., 1995). Esse sistema de regulação difere do sistema de *K. pneumoniae* onde a transcrição de NifA é dependente de NtrC-P (MERRICK, 1992). Entretanto, NtrC é necessária para atividade máxima da nitrogenase, embora provavelmente não atue diretamente sobre promotores de NifA (LYANG et al., 1993). Estudos de deleção da porção N-terminal de NifA de *A. brasilense* e *H. seropedicae* mostraram que essa região não é essencial para a sua atividade. Nestes

organismos a porção N-terminal de NifA inibe a sua própria atividade em presença de amônio (ARSENE et al., 1996 e MONTEIRO et al., 1999).

Estudo com fusões *lacZ* em mutante *glnB*⁻ de *A. brasilense* mostraram que a proteína NifA é expressa neste mutante, embora incapaz de ativar a transcrição dos genes *nif* (ARSENE et al., 1996). A proteína NifA de *K. pneumoniae* é capaz de restaurar o fenótipo Nif⁺ do mesmo (ARSENE et al., 1996). Isso indica que NifA de *A. brasilense* é inativa em mutante *glnB* de *A. brasilense* e que a proteína GlnB é necessária para a sua atividade. O mecanismo proposto de regulação sugere que em presença de íons amônio NifA está inativo, pois o domínio N-terminal está enovelado sobre os domínios C-terminal e central, impedindo a ligação deste domínio ao DNA e/ou formação de complexo aberto (ARSENE et al., 1996). Entretanto, em ausência de amônio e presença de GlnB, o domínio N-terminal não atuaria sobre as regiões catalíticas da molécula, permitindo a ativação de transcrição dos genes *nif*. Não foi estabelecido se a proteína GlnB interage diretamente com a proteína NifA ou se atua modulando a atividade de outra proteína (ARSENE et al., 1996). O estudo de mutantes *glnD* (UTase) de *A. brasilense* mostra que eles apresentam um fenótipo Nif⁻, indicando que PII-UMP é a forma ativa necessária para a ativação de NifA (ARSENE, KAMINSKI & ELMERICH, 1996). Em *Herbaspirillum seropedicae* mutantes *glnB* também são incapazes de fixar nitrogênio indicando que a proteína GlnB (PII) também pode participar na sinalização dos níveis de nitrogênio para NifA (BENELLI et al., 1997).

1.3.3.4 A proteína sensora GlnD

A proteína GlnD é o sensor primário dos níveis de nitrogênio, que é determinado pelas concentrações intracelulares de glutamina. A proteína GlnD foi encontrada em *E. coli* (VAN HEESWIJK et al., 2000), *K. pneumoniae* (EDWARDS e MERRICK., 1995), *Azotobacter vinelandii* (CONTRERAS et al., 1991), *Rhizobium leguminosarum*

(SCHLUTER et al., 2000), *R. tropici* (O'CONNELL et al., 1998), *Sinorhizobium meliloti* (RUDNICK et al., 2001), *Corynebacterium glutamicum* (JAKOBY et al., 1999) e *Azospirillum brasilense* (VAN DOMMELEN et al., 2002). Essa enzima apresenta duas atividades: uridililtransferase e enzima removedora de uridilil (ARCONDÉGUY et al., 2001). Em baixa concentração intracelular de amônio, a proteína GlnD assume atividade uridililtransferase e transfere um grupamento UMP para o resíduo tirosina-51 de cada monômero das proteínas do tipo PII. Em alta concentração de íons amônio, a proteína GlnD assume atividade removedora de grupamento uridilil das proteínas do tipo PII.

A proteína GlnD de *A. brasilense* apresenta 933 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de 104,6 kDa. Quando comparada com proteínas GlnD de outros organismos, a maior similaridade foi obtida com a proteína GlnD de *Rhizobiaceae* (62-63 % de similaridade) (VAN DOMMELEN et al., 2002).

O mutante *glnD* de *A. brasilense* não cresce utilizando nitrato como fonte de nitrogênio (assim como em *K. pneumoniae* e *K. aerogenes*) e, ao contrário das enterobactérias (BLOOM et al., 1978; FOOR et al., 1978; BUENO et al., 1985 e EDWARDS e MERRICK, 1995), não é auxotrofo para glutamina (VAN DOMMELEN et al., 2002).

Pouco se sabe sobre a expressão de *glnD*, mas aparentemente é monocistrônico, não tendo sido localizado nenhum sítio de ligação a NtrC. Além disso, sua expressão é relativamente alta na presença de excesso de amônio, mas apresenta expressão ainda aumentada em condições de fixação de nitrogênio, sugerindo uma dependência parcial do sistema Ntr (VAN DOMMELEN et al., 2002). Aparentemente, *glnD* é essencial em muitos organismos, sendo muitas vezes impossível a obtenção de formas viáveis após inativação total deste gene. Nestes organismos a obtenção de mutantes *glnD* aparentemente só é viável com a ocorrência de mutações secundárias espontâneas (COLNAGHI et al. 2001; PERLOVA et al., 2000). Essa observação é consistente com a função desta proteína no sensoriamento intracelular dos níveis de nitrogênio, mas pode

1.3.4 Regulação da Fixação de Nitrogênio

O sistema Ntr monitora os níveis de glutamina, 2-cetoglutarato e ATP, modificando os níveis de expressão gênica e atividade enzimática, dependendo das condições intracelulares de nitrogênio fixado, disponibilidade de carbono e energia (JIANG, PELISKA & NINFA, 1998a). Destes efetores, glutamina e 2-cetoglutarato são os mais importantes (JIANG, PELISKA & NINFA, 1998a).

A proteína GlnD é uma enzima chave do sistema Ntr porque catalisa a uridililação e desuridililação das proteínas tipo PII (GlnB e GlnZ). Na forma uridililada, GlnB e GlnZ sinalizam baixos níveis de nitrogênio fixado, enquanto que na forma não modificada sinalizam altos níveis de nitrogênio. A glutamina é o principal indicador da concentração intracelular de nitrogênio fixado (JIANG, PELISKA & NINFA, 1998a). GlnD possui um sítio para glutamina e a ligação deste metabólito estimula sua atividade de enzima removedora de uridilil (JIANG, PELISKA & NINFA, 1998a). Essa atividade leva à desuridililação da proteína PII e, desta forma, interage com NtrB, que assume atividade de fosfatase e defosforila NtrC, desativando-a. Quando a concentração de glutamina é baixa (ou seja, baixos níveis de nitrogênio intracelular), GlnD livre possui atividade de uridilil transferase e adiciona um grupo UMP em cada subunidade das proteínas PII. Desta forma, PII-UMP é capaz de interagir com a proteína NifA, que ativa a transcrição dos genes *nif*. Além disso, PII-UMP é incapaz de interagir com NtrB que, na forma livre, assume característica de histidina-quinase e fosforila NtrC, ativando-a. (KAMBEROV et al., 1994). A proteína NtrC é ativadora de transcrição de vários genes que codificam para vias de utilização de fontes alternativas de nitrogênio, tais como, utilização de aminoácidos, de nitrato e, nos diazotrofos, N₂.

1.3.5 Integração dos Sinais de Nitrogênio Intracelular Fixado, Disponibilidade de Carbono e Energia pelas Proteínas PII

Os níveis de 2-cetoglutarato também afetam a capacidade de sinalização das proteínas PII e constituem uma forma eficiente de integrar os sinais de nitrogênio e carbono intracelulares (MAGASANIK et al., 2001). Este efeito está melhor documentado na proteína GlnB de *E. coli*, mas outros estudos sugerem que seja uma característica geral das proteínas PII, diferindo no ajuste fino das constantes de afinidade com o efetor e as proteínas receptoras (BENELLI et al., 2002; ARAÚJO et al., 2004; ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK,).

A proteína GlnB de *E. coli* é capaz de ligar 2-cetoglutarato; o homotrímero, portanto, pode ligar três moléculas desse efetor. Entretanto, a proteína GlnB assume várias conformações, dependendo do número de moléculas de 2-cetoglutarato ligadas a ela (JIANG & NINFA, 1999). A ligação da primeira molécula deste efetor ao homotrímero, exerce um forte efeito de cooperatividade negativa sobre a ligação da segunda e terceira moléculas. O resultado é que a proteína PII liga-se com grande afinidade a primeira molécula de 2-cetoglutarato, em concentrações da ordem de micromols por litro (0,1mmol/L), mas só estará saturada quando forem alcançadas as maiores concentrações fisiológicas encontradas deste intermediário (0,9 mmol/L) (KAMBEROV et al., 1994). O 2-cetoglutarato ligado a GlnB parece ser fundamental na sua interação com as proteínas receptoras NtrB, GlnD e GlnE (JIANG, PELISKA & NINFA, 1998).

A uridililação de GlnB (dependente da concentração de glutamina), ou a ligação de uma molécula de 2-cetoglutarato (elevada concentração intracelular, ~1 mM) a GlnB, impedem a sua ligação a NtrB que, na forma livre, fosforila NtrC, ativando-a (KAMBEROV et al., 1994). Experimentos *in vitro* mostraram que a presença de pequenas quantidades de 2-cetoglutarato (cerca de 100 μ M) estimula a interação de GlnB com

NtrB, inibindo a atividade de quinase e estimulando a atividade de fosfatase (JIANG & NINFA, 1999). Como resultado, NtrC-P é desfosforilado e perde a capacidade ativar a transcrição (JIANG & NINFA, 1999).

Em muitos organismos, mas não em *A. brasilense* (DE ZAMAROCZY et al., 1996), GlnB também controla o estado de adenililação da glutamina sintetase (GS) em resposta a concentração de glutamina e 2-cetoglutarato (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). Em *E. coli*, GlnB-UMP é capaz de interagir com a proteína GlnE (ATase) promovendo a desadenililação de GS, enquanto que a presença de GlnB livre e glutamina, sinaliza para que ocorra a adenililação desta enzima, inativando-a (JIANG, PELISKA & NINFA, 1998). A ligação de uma molécula de 2-cetoglutarato a GlnB impede a interação GlnB-ATase inibindo sua atividade de adenililtransferase e estimulando a atividade de enzima removedora de adenilil (JIANG et al., 1998, ARCONDÉGUY, 2001).

Assim como GlnB, GlnK de *E. coli* é capaz de se ligar ao 2-cetoglutarato com uma alta afinidade (ATKINSON e NINFA, 1999). Diferentemente de GlnB, baixas concentrações de 2-cetoglutarato não estimulam a adenililação de GS por GlnK, entretanto, altas concentrações de 2-cetoglutarato promovem uma mudança conformacional na proteína que se torna incapaz de interagir com NtrB ou GlnE (ATKINSON & NINFA, 1999).

Sumarizando, o efeito antagônico entre 2-cetoglutarato e glutamina na regulação da adenililação de GS ou na ativação de promotores dependentes de NtrC ocorre devido ao efeito da glutamina sobre a GlnE e GlnD e do efeito do 2-cetoglutarato na conformação e afinidade de GlnB. Altas concentrações de 2-cetoglutarato são necessárias para inibir a ligação de GlnB a GlnD, a estimulação da atividade removedora de adenilil da ATase e para a inibição da interação com NtrB (JIANG & NINFA, 1999). Por outro lado, baixos níveis de 2-cetoglutarato promovem a interação de GlnB-UMP a GlnD, ativando a desuridililação na presença de glutamina, estimulação da atividade de GlnE e da ligação GlnB-NtrB (JIANG, PELISKA & NINFA, 1998).

O sítio de ligação de ATP é altamente conservado nas proteínas PII (XU et al., 1998). A ligação de ATP e 2-cetoglutarato simultaneamente permite a integração dos sinais de carbono e energia da célula (ARCONDÉGUY, 2001). Entretanto o efeito de ATP no controle do sistema Ntr ainda não está claro.

1.3.6 PII e seu Controle no Metabolismo de Nitrogênio em Outros Organismos

As proteínas PII desempenham papel fundamental no sensoriamento dos níveis de nitrogênio. Vários organismos possuem duas ou mais parálogas da família PII, que podem atuar de maneira cooperativa (ARCONDÉGUY, JACK & MERRICK, 2001). Em *K. pneumoniae*, por exemplo, a proteína GlnB controla a atividade de NtrB/NtrC e os níveis de NtrC fosforilado por NtrB, controlam a expressão de uma segunda proteína PII, GlnK e a expressão dos genes *nifLA* (MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004). O controle de GlnB sobre o sistema NtrB/NtrC já foi apresentado acima (ítem 1.3.4) e a presença de NtrC fosforilada (indicando condições de depleção de nitrogênio) é capaz de ativar os promotores dependentes do fator σ^{54} como o operon *nifLA* e *glnKamtB* (MERRICK, 1992). Em *K. pneumoniae* há um segundo sistema de regulação que envolve a proteína GlnK, que desempenha uma importante função na atividade de NifA. Independentemente do seu estado de uridililação, GlnK inibe a ação de NifL e estimula a ativação de NifA, permitindo a expressão dos genes *nif* (HE et al., 1998). Como a expressão de GlnK é controlada por NtrC, a sua presença reflete condições limitantes de nitrogênio (HE et al., 1998; JACK, DE ZAMAROCZI e MERRICK, 1999). Em *K. pneumoniae* a concentração citoplasmática da proteína GlnK também é regulada pela sua interação com a proteína de membrana AmtB (COUTTS et al., 2002; JAVELLE et al., 2003). O aumento nas concentrações de íons amônio leva a desuridililação de GlnK por GlnD e, dessa forma, GlnK se associa à proteína AmtB, permanecendo na fração de membrana e sendo removida do citoplasma. Assim, a quantidade de GlnK presente no citoplasma para a

interação com NifL e NifA em *K.pneumoniae* parece ser controlada tanto em nível do promotor de *glnKamtB* quanto pós-traducionalmente pelo seqüestro de GlnK para a membrana (LITTLE & DIXON, 2004).

Em *Azotobacter vinelandii* foi encontrada somente uma proteína PII, GlnK, que faz parte do operon *glnKamtB* (MELETZUS et al., 1998). A expressão desse operon e dos genes *nifLA* é independente de NtrC. Nesse organismo, GlnK atua sobre NifL estimulando a inibição de NifA, em altas concentrações de nitrogênio. Essa regulação do controle de transcrição dos genes *nif* é dependente da uridililação de GlnK uma vez que mutantes *glnD* ou *glnKY51-F*, que codificam para proteína GlnK incapazes de serem uridililadas, resultam na inibição da atividade de NifA por NifL (RUDNICK et al., 2002). Estudos *in vitro* realizado por LITTLE e colaboradores (2000), também mostraram que somente a forma não uridililada de GlnK é capaz de interagir com NifL estimulando a inibição de NifA. Em condições limitantes de nitrogênio, GlnK encontra-se uridililada e nesta forma não interage com NifL, permitindo que NifA ative a transcrição dos genes *nif*. (LITTLE et al., 2000; LITTLE & DIXON, 2003; MARTINEZ-ARGUDO, LITTLE & DIXON, 2004). Nesse organismo a atividade de NifA também responde às concentrações de ATP é regulada pela concentração de 2-cetoglutarato. Entretanto, quando ocorre um aumento na concentração de nitrogênio, GlnK livre interage com NifL para promover a formação do complexo inativo GlnK-NifL-NifA, mesmo em altas concentrações de 2-cetoglutarato, sobrepondo-se aos sinais de concentração de carbono intracelular (LITTLE & DIXON, 2003).

1.3.7 Regulação Pós-Traducional da Atividade de Nitrogenase

A atividade de nitrogenase em muitos diazotrofos é reversivelmente inibida *in vivo* pela adição de íons amônio. Após o consumo do amônio adicionado, a atividade volta aos valores iniciais. Esse fenômeno é denominado *switch-off/switch-on* ou

desligamento/religamento da nitrogenase (ZUMFT et al., 1978). Em alguns microrganismos como *Rhodospirillum rubrum* (LIANG et al., 1991), *Azospirillum brasilense* (ZHANG et al., 1993) e *Rhodobacter capsulatus* (MASEPOHL, KREY & KLIPP, 1993) este controle da atividade envolve a ação de duas outras enzimas: dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT, produto do gene *draT*) e dinitrogenase redutase glicohidrolase (DraG, produto do gene *draG*). Os genes *draT* e *draG* de *A. brasilense* e de *A. lipoferum* estão localizados à montante do operon *nifHDK* e são constitutivamente co-transcritos em direção oposta a esse operon (FU et al., 1990; ZHANG et al., 1993).

Na presença de altas concentrações de íons amônio, a proteína DraT (monômero de 30 kDa) transfere o grupamento ADP-ribosil do NAD^+ para o resíduo Arg101 de uma das subunidades da proteína Fe, formando uma ligação N-glicosídica (LOWERY et al., 1986, ZHANG et al., 1993 e 1997). Nessa forma, a proteína Fe não pode se associar com a proteína FeMo, impedindo a formação do complexo da nitrogenase, transferência de elétrons entre essas proteínas e a redução dos substratos. Quando os níveis de amônio tornam-se novamente baixos e na presença de ATP, a proteína DraG (monômero de 32 kDa) catalisa a remoção do grupamento ADP-ribosil pela clivagem da ligação glicosídica, reativando a nitrogenase (LUDDEN & ROBERTS, 1989; HALBLEID & LUDDEN 2000).

Além dos íons amônio, uma deficiência de energia como ocorre em *A. brasilense* sob condições de anaerobiose e passagem de período luminoso para escuro em *R. rubrum*, promovem a inativação da nitrogenase mediada pelo sistema DraT/DraG. (ZHANG et al., 1993). As vias de sinalização de excesso de nitrogênio ou deficiência de energia aparentemente são diferentes e permanecem desconhecidas (STEENHOUDT et al., 2000).

A figura 5 mostra o perfil de desligamento e religamento da nitrogenase em uma cultura de *R. rubrum* por adição de amônio. Antes da adição de amônio (I), DraT é inativa e DraG é ativa. Essa conclusão é baseada no fato de que mutante *draG* apresenta atividade de nitrogenase mesmo que amônio seja adicionado ao meio, demonstrando que

DraT deve estar inativa durante condições de fixação de nitrogênio. Quando amônio é adicionado, DraT torna-se rapidamente ativa e DraG é inativada (II). A proteína DraT é ativada enquanto que DraG permanece inativa até todo amônio ser metabolizado (III). Quando a atividade de nitrogenase é restabelecida, DraG é ativada e permanece ativa (IV) (NORDLUND *et al.*, 2000).

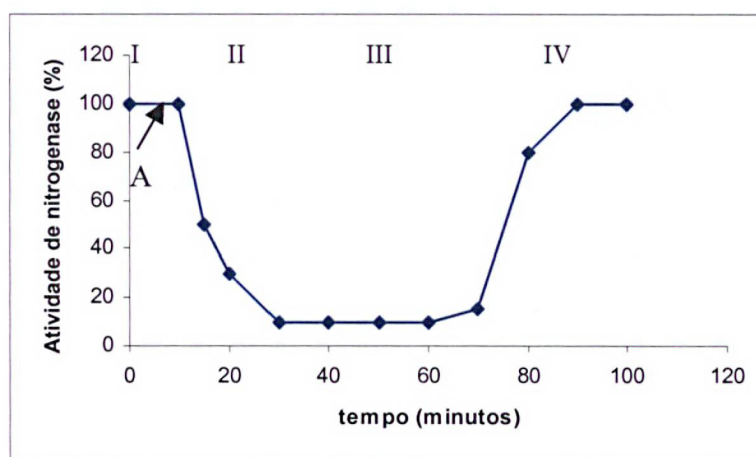


Figura 5- Curso da atividade de nitrogenase durante o “switch-off”. A adição de íons amônio ocorre em A. Os quatro períodos indicados (I-IV) são discutidos no texto (NORDLUND, 2000)

Ainda não se sabe como as atividades de DraT e DraG são reguladas coordenadamente. Uma hipótese de regulação da ADP-ribosilação da nitrogenase em *R. rubrum* envolve a formação de um complexo entre DraT e DraG (GRUNWALD e LUDDEN *et al.*, 1997). Além disso, aparentemente as atividades destas duas enzimas dependem da presença de uma molécula sinalizadora intracelular (GRUNWALD & LUDDEN *et al.*, 1997).

Evidências recentes têm apontado para o envolvimento de proteínas da família PII na sinalização de choque de amônio para o sistema DRAT-DRAG. Uma estirpe mutante

de *R. rubrum* expressando o gene *glnBY51-F* apresentou uma queda na atividade de nitrogenase muito mais rápida após adição de amônio do que a estirpe selvagem (ZHANG et al., 2000). Além disso neste mutante, mesmo em condições de fixação de nitrogênio, foi encontrada uma alta atividade da proteína DraT indicando que a regulação da atividade desta enzima está alterada (ZHANG et al., 2000). Em condições de fixação de nitrogênio, mutantes *draG* exibem uma atividade de nitrogenase normal, entretanto quando a proteína GlnBY51-F é expressa nesta estirpe, a atividade de nitrogenase diminui consideravelmente (10-20% do conteúdo de proteína-Fe em relação à estirpe selvagem) que ainda se encontra totalmente ADP-ribosilada (ZHANG et al, 2000).

Usando um sistema heterólogo de expressão de DraG e DraT em *K. pneumoniae* demonstrou-se que em mutantes *glnK* a atividade de DraT permanece inalterada, entretanto, DraG encontra-se permanentemente ativa e não regulada pela adição de amônio (ZHANG et al., 2001). Os dados indicam que tanto GlnB quanto GlnK são necessárias para a regulação do sistema DraT e DraG e que, aparentemente, GlnB atua na proteína DraT, enquanto que a proteína GlnK tem efeito sobre DraG. Ainda não se sabe se esse efeito é direto ou indireto sobre estas proteínas (ZHANG et al., 2001). De fato, Klassen e colaboradores (2001 e 2005) demonstraram a participação das proteínas GlnB e GlnZ no sistema DraT/DraG em *A. brasilense*. Mutantes *glnB* expressando a proteína NifA N-truncada, portanto capaz de fixar nitrogênio mesmo na ausência de GlnB, apresenta deficiência no desligamento da nitrogenase após adição de íons amônio. Esse resultado mostra o envolvimento de GlnB sobre a proteína DraT (KLASSEN et al., 2005). Klassen e colaboradores mostraram ainda que mutantes *glnZ* de *A. brasilense* são incapazes de recuperar a atividade da nitrogenase após a adição e o consumo de 0,2 mM de amônio. Os resultados sugerem que GlnZ atue regulando a atividade de DraG, mas ainda não foi estabelecido se esse efeito é direto ou indireto (KLASSEN et al., 2001). A superexpressão de DraT-His (contendo hexa-histidina na região N-terminal) em *A. brasilense* levou à modificação de NifH mesmo na ausência de adição de amônio (HUERGO et al., 2004). Em contrapartida, quando DraG-His é superexpressa no mesmo

organismo a proteína-Ferro não pode ser ADP-ribosilada completamente, mesmo após a adição de 1 mM de amônio, sugerindo que a atividade de DraT e DraG é regulada por efetor de concentração intracelular limitada (HUERGO et al., 2004).

Estudos de substituição do resíduo Arg-101 de NifH de *A. brasilense* revelou a presença de um segundo mecanismo de regulação da atividade da nitrogenase, independente da ADP-ribosilação (ZHANG et al., 1996). Essa forma de regulação de nitrogenase foi descrita em *A. vinelandii* (KLUGKIST et al., 1984 e LANNE et al., 1980), *A. amazonense* (HARTMANN et al., 1986), *Acetobacter diazotrophicus* (BODDEY et al., 1991 e BURRIS et al., 1991), *Herbaspirillum seropedicae* (FU et al., 1989) *Anabaena variabilis* (DURNER et al., 1994) e *Rhodobacter sphaeroides* (HAAKER et al., 1982, JONES et al., 1979 E YOCH et al., 1988). Essas bactérias não possuem o sistema DraT/DraG mas a nitrogenase sofre inibição reversível. Em *Rhodobacter capsulatus* esse segundo mecanismo de regulação é extremamente rápido e inibe completamente a atividade da nitrogenase (PIERRARD et al., 1993).

Mutantes *ntrC* de *A. brasilense* e *R. rubrum* apresentam a atividade de regulação de nitrogenase por íons amônio reduzida (ZHANG et al., 1994). O efeito primário parece ser alteração na atividade de DraG. Esses dados sugerem que NtrC pode estar envolvido num circuito de sinalização para o sistema DraT/DraG, possivelmente regulando a expressão de proteínas sinalizadoras (ZHANG et al., 1994). O desligamento da nitrogenase por anaerobiose nestes mutantes permanece inalterado, sugerindo que diferentes estímulos ambientais (anaerobiose, NH_4^+) provavelmente utilizam vias de sinalização para ADP-ribosilação da dinitrogenase diferentes (STEENHOUDT et al., 2000; ZHANG et al., 1994).

1.3.8 Participação das Proteínas PII na Regulação do Sistema de Transporte

As proteínas do tipo PII desempenham um importante papel na utilização e captação de nitrato em muitos organismos como *Bacillus subtilis*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum brasilense* entre outros. Mutantes *glnB* de *R. leguminosarum* e *B. subtilis* são incapazes de utilizar o nitrato como fonte de nitrogênio, sugerindo que a proteína GlnB possa ser necessária para utilização de nitrato (WRAY, ATKINSON e FISCHER., 1994; AMAR et al., 1994). Mutantes *glnB* de *A. brasilense* excretam amônio quando as células são crescidas utilizando nitrato como fonte de nitrogênio. A falta da inativação de NtrC por GlnB leva a perda da regulação da via de assimilação de nitrato, dependente do sistema *ntr*, com um conseqüente acúmulo na concentração intracelular de amônio e sua conseqüente excreção (DE ZAMAROCZY et al., 1998). A esse efeito soma-se as baixas concentrações de GS encontradas neste mutante (DE ZAMAROCZY et al., 1996). A proteína GlnZ de *A. brasilense* aparentemente regula negativamente o transporte de metilamônio. Foi sugerido que a proteína GlnZ possa estar interagindo com a proteína AmtB regulando esse processo (DE ZAMAROCZY et al., 1998).

Foi demonstrado em *Klebsiella pneumoniae* que a proteína GlnK está envolvida no transporte de amônio pela proteína AmtB. Nesse organismo, variações micromolares na concentração extracelular de amônio leva a desuridililação da proteína GlnK e seu seqüestro por AmtB, permanecendo ligada à membrana até que os níveis de nitrogênio voltem a baixar (COUTTS et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Estudo das proteínas mutantes GlnB e GlnZ no metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasilense*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Construir mutantes pontuais nos genes *glnB* e *glnZ* de *A. brasilense*;
- Determinar o efeito das proteínas mutantes na atividade de nitrogenase em *A. brasilense*;
- Determinar a participação das proteínas GlnZ mutantes na inativação da nitrogenase por adição de íons amônio;
- Determinar a participação das proteínas PII na excreção de amônio;
- Determinar o efeito das proteínas mutantes no sistema de assimilação de amônio e metilamônio;
- Determinar o envolvimento da proteína GlnB com o sistema de assimilação de nitrato, dependente de NtrC;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTIRPES E PLASMÍDEOS

As estirpes e plasmídeos utilizados nesse trabalho estão listadas na TABELA1.

TABELA 1- Bactérias e plasmídeos

Estirpe ou plasmídeo	Genótipo/Fenótipo	Referência ou Fonte
<i>Azospirillum brasilense</i>		
FP2	estirpe selvagem, Sp7 Nif ⁺ Nal ^r Sm ^r	PEDROSA e YATES, 1984
7628	Nif ⁺ <i>glnB</i> :: kan, Km ^r	de ZAMAROCZY et al., 1996
7611	Nif ⁺ <i>glnZ</i> ::Ω, Sp ^r Sm ^r	de ZAMAROCZY et al., 1998
2812	<i>glnB</i> ::kan/ <i>glnZ</i> ::Ω, Sm ^r Km ^r	de ZAMAROCZY et al., 1998
FAJ310	<i>amtB</i> ::kan, Km ^r	de ZAMAROCZY et al., 1998
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>endA recA</i> Nal ^r	SAMBROOK et al., 1989
S17.1	RP4-2 Tc ^r ::Mu Km ^r ::Tn7 <i>tra</i> ⁺ <i>recA</i> , Sm ^r	SIMON et al., 1983
71-18	Δ(<i>lac-pro</i>) F' <i>lacI</i> ^q Z M15 <i>pro</i> ⁺	MESSING et al, 1977
DH10B	F [<i>proAB</i> + <i>lacZ</i> ΔM15], Sm ^r	INVITROGEN
<i>Plasmídeos</i>		
pRK2013	Km ^r , <i>tra</i> ⁺	FIGURSKI e HELINSKI, 1979
pLAFR3.18	Tc ^r , derivado do vetor pLAFR3 contendo o sítio de policlonagem do vetor pTZ18R	MACHADO et al., 1995
pTZ19R	Amp ^r , vetor multifuncional de clonagem e seqüenciamento, <i>plac</i>	MEAD et al., 1986
pTZ18R	Amp ^r , vetor multifuncional de clonagem e seqüenciamento, <i>plac</i>	MEAD et al., 1986
pLMA-2	Amp ^r , <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> em pTZ19R, ARAÚJO, L.M. et al., 2004 <i>plac</i>	
pMSA-2	Amp ^r , <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> em pTZ19R, ARAÚJO, M. S. et al., 2004 <i>plac</i>	

pJI4	Amp ^r , <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> em pTZ18R, Este trabalho <i>plac</i>
pJI8	Amp ^r , <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> em pTZ18R, Este trabalho <i>plac</i>
pJI6	Amp ^r , <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> mutante L13→P Este trabalho (proteína GlnB-P) em pTZ18R, <i>plac</i>
pJI9	Amp ^r <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> mutante Este trabalho V100→A (proteína GlnB-A) em pTZ18R, <i>plac</i>
pJI10	Tc ^r , <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> mutante L13→P Este trabalho (proteína GlnB-P) em pLAFR3.18, <i>plac</i>
pJI11	Tc ^r , <i>glnB</i> de <i>A. brasilense</i> mutante V100→A Este trabalho (proteína GlnB-A) em pLAFR3.18, <i>plac</i>
pJIZ2	Amp ^r , <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> mutante Este trabalho I45→T; R101→C (proteína GlnZ-IR) em pTZ18R, <i>plac</i>
pJI1	Tc ^r , <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> em pLAFR3.18, Este trabalho <i>plac</i>
pJI13	Tc ^r , <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> mutante I45→T; Este trabalho R101→C (proteína GlnZ-IR) em pLAFR3.18, <i>plac</i>
pJIZ51	Amp ^r , <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> mutante Este trabalho Y51→F (proteína GlnZ-51) em pTZ18R, <i>plac</i>
pJILZ51	Tc ^r , <i>glnZ</i> de <i>A. brasilense</i> mutante Y51→F Este trabalho (proteína GlnZ-51) em pLAFR3.18, <i>plac</i>

3.2 REAGENTES

Tris base, glicerol, antibióticos, e dodecilsulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Agar, agarose e fenol foram obtidos da empresa Invitrogen. Álcool isoamílico, clorofórmio, isopropanol ácido acético, metanol, etanol, hidróxido de sódio, cloreto de amônio e EDTA foram adquiridos da

Merck. Extrato de levedadura, triptona e ágar bacteriológico foram adquiridos da Merck, Oxoid ou Biobrás. As enzimas modificadoras de DNA e RNase foram adquiridas da G. E. Health Care, Invitrogen ou New England Biolabs. Os gases nitrogênio, hidrogênio, acetileno, ar comprimido e etileno padrão (100ppm) foram adquiridos de White Martins S.A. Os demais reagentes utilizados foram obtidos de diversos fornecedores, sendo eles todos para biologia molecular.

3.3 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *Azospirillum brasilense* foram cultivadas em meio NFbHP lactato (MACHADO et al., 1991) cuja composição é apresentada abaixo. A fonte de nitrogênio foi NH_4Cl (4 ou 20 mmol/l) ou glutamato (5 mmol/L). As soluções de fosfato e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento de uso. A adição dessas soluções confere ao meio um pH de 6,8. As culturas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120 rpm e 30 °C.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB e em meio SOB para o preparo de células eletrocompetentes (SAMBROOK et al., 1989), sob agitação constante de 130 rpm a 37°C. O meio sólido MacConkey (Miller, 1992) foi utilizado para diferenciação das estirpes de *E. coli lac*⁺ e *lac*⁻. As estirpes foram cultivadas por um período de até 16 horas.

Para o cultivo em meio líquido foi estabelecida uma relação de 1/5 entre o volume do meio e o volume total do frasco empregado. Estoques das culturas de *E. coli* e *A. brasilense* foram mantidos em suspensão de glicerol 50% e conservados à -20°C.

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave à temperatura de 120°C durante 20 minutos.

As composições dos meios utilizados para o cultivo são apresentadas abaixo:

MEIO LB

Componentes	g/L
Triptona	10
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	10

O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 2 mol/L. O meio sólido foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15g/L ao meio líquido, sendo denominado LA.

MEIO SOB (SAMBROOK et al., 1989)

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

MEIO NFbHP

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

Os meios NFbHP sólido e semi sólido foram obtidos adicionando-se 15g/L ou 1,7 g/L de ágar bacteriológico ao meio líquido, respectivamente. O pH final do meio foi de 6.8.

O meio MACCONKEY utilizado foi obtido na forma semi-desidratada pela empresa Oxoid. O meio foi preparado conforme recomendações do fabricante.

3.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram utilizados para a seleção e crescimento de bactérias e suas respectivas concentrações estão descritas na TABELA 2.

As soluções de antibióticos foram preparadas em água bidestilada autoclavada, e foram esterilizadas por filtração em filtro Millipore HAWP 0,23µm. A solução estoque de tetraciclina foi preparada com etanol 50% e estocada sob abrigo da luz.

Todas as soluções foram estocadas à -20°C.

TABELA 2- Concentração dos antibióticos utilizados

	Solução-estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ácido nalidíxico (Nal)	10	10 ^a
Ampicilina (Amp)	100	250 ^a
Estreptomicina (Sm)	80	80 ^a , 20 ^b
Canamicina (Km)	100	100 ^a
Tetraciclina (Tc)	10	10 ^{a,b}

^a: *Azospirillum brasilense*

^b *Escherichia coli*

3.5 MANIPULAÇÃO GÊNICA

As reações de purificação de DNA, digestão com endonucleases de restrição, reação de ligação, eletroforese em gel de agarose e transformação bacteriana foram feitas conforme SAMBROOK et al (1989).

3.6 MUTAGÊNESE ALEATÓRIA DOS GENES *glnB* E *glnZ* DE *A. brasilense*

Para a mutagênese aleatória dos genes *glnB* e *glnZ* de *A. brasilense* foi utilizado o método descrito por LIN-GOERK et al. (1997) com algumas modificações.

Inicialmente os genes *glnB* (utilizando como molde o plasmídeo pLMA-2) e *glnZ* (utilizando como molde o plasmídeo pMSA-2) foram amplificados a partir de reação em cadeia da polimerase. O sistema (50µL) continha tampão de PCR (10 mmol/L Tris-HCl pH 8,3, 50 mmol/L de KCl), 2 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de dNTP, 10 pmol de primer reverso e do universal e 1,5U Taq DNA polimerase (2 µL). A reação de amplificação consistiu dos seguintes passos:

etapa 1: 95°C-5 min (1 ciclo)

etapa 2: 95°C-30 seg, 30°C-1min, rampa de 2,5min

72°C-2min (40 ciclos)

etapa 3: 72°C-10min (1 ciclo)

O produto dessa reação foi utilizado como molde na reação de amplificação mutagênica. Este sistema continha tampão de PCR (10 mmol/L Tris . HCl pH 8,3, 50 mmol/L KCl), 1,5 mmol/L MgCl₂ , 20 µmol/L de dNTP, e 10 pmol dos primers reverso e universal, 0,25 mmol/L de MnCl₂ (adicionado imediatamente antes da reação) e 3U de enzima Taq DNA polimerase .

O produto amplificado obtido foi digerido com as enzimas *KpnI/HindIII* quando na reação de amplificação foi utilizado como molde o gene *glnB*, ou *SstI/HindIII* quando utilizado como molde o gene *glnZ*, e ligado utilizando a enzima T4 DNA

ligase ao vetor pTZ18R digerido com as mesmas enzimas. O produto de ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α e plaqueado em meio MacConkey. As colônias de transformantes foram cultivadas em meio LB e o plasmídeo recombinante isolado e analisado por eletroforese em gel de agarose após restrição com *Hind*III. Os clones selecionados foram seqüenciados utilizando os oligonucleotídeos universal e reverso afim de se identificar a presença de mutações.

Foram identificados dois clones contendo alterações no gene *glnB* de *A. brasilense*. São eles: pJI6 (L13→P) e pJI9 (V100→A). Um clone contendo alteração no gene *glnZ* foi identificado, sendo denominado pJIZ-2, o qual contém as substituições I45→T e R101→C.

3.7 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DOS GENES *glnB* E *glnZ* DE *A. brasilense*

Para a obtenção de mutantes *glnB* e *glnZ* contendo a substituição tirosina 51 por fenilalanina (Y51-F) a técnica do *megaprimer* foi utilizada. A figura 6 mostra um esquema do método utilizado. Para obter as mutações de interesse, foram construídos oligonucleotídeos específicos que anelam nos respectivos genes, sobrepondo em aproximadamente 20 pares de base da região de alvo de mutação. Nessa região foi modificado o códon de transcrição Y51-F. Os oligonucleotídeos foram construídos através de síntese química utilizando fosforamidites em um Gene Assembler da Pharmacia. Os oligonucleotídeos construídos têm as seqüências:

p*glnBY*51F 5' G GAA GTC GAC CAC AAA CTC C 3'
 p*glnZY*51F 5' CAG GAA GCT CAC GGA AAA CTC G 3'

Em vermelho, são apresentados os nucleotídeos que substituíram a timina presente nesta posição por adenina, tanto em *glnB*, quanto em *glnZ* de *A. brasilense*.

Os plasmídeos pJI4 e pJI8 (0,5-1,0 μ g) foram utilizados como molde em um sistema (25 μ L) contendo tampão de PCR (10 mmol/L Tris-HCl pH 8,3, 50 mmol/L de

KCl), 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de dNTP, 10 pmol de primer reverso e mutagênico e 1,5U Taq DNA polimerase.

A reação de amplificação consistiu dos seguintes passos:

etapa 1: 95° C- 5min (1 ciclo)

etapa 2: 94 ° C- 30 seg —

57 °C-30 seg

72 ° C-30 seg (30 ciclos)

etapa 3: 72 ° C- 7min (1 ciclo)

O produto dessa reação, denominado *megaprimer*, foi purificado utilizando o Kit GFX (G. E. Health Care).

Uma segunda reação de amplificação foi realizada utilizando como molde os plasmídeos pJI4 e pJI8, em um sistema de reação idêntico ao anterior, mas utilizando 10 pmol de primer universal e 10 ng do megaprimer purificado em coluna GFX (G. E. Health Care). O programa de temperatura para a reação de amplificação foi:

etapa 1: 95° C- 5min (1 ciclo)

etapa 2: 94 ° C- 30 seg,

45 ° C- 30 seg

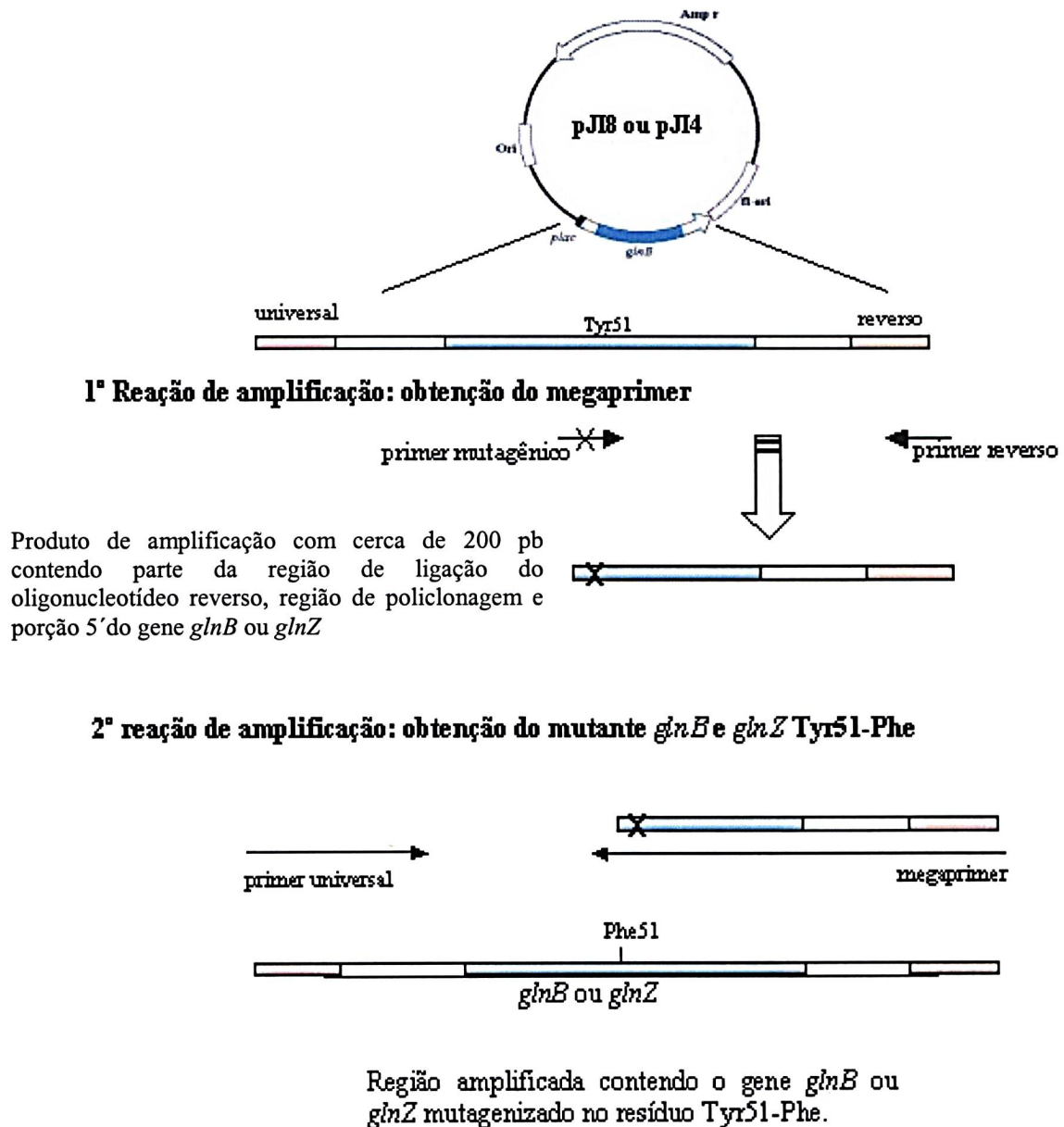
72 ° C- 2 min (30 ciclos)

etapa 3: 72 ° C- 7min (1 ciclo)

O produto da segunda reação de amplificação a partir do plasmídeo pJI4 (*glnZ*, pTZ18R) foi digerido com as enzimas *SstI*/*HindIII* e ligado ao vetor pTZ18R digerido de com as mesmas enzimas. O produto obtido a partir de reação utilizando o plasmídeo pJI8 foi digerido com as enzimas *KpnI*/*HindIII* e ligado ao vetor pTZ18R ou pDK6 digeridos com as mesmas enzimas. O produto de ligação foi transformado em *E. coli* DH10B e os clones obtidos foram seqüenciados para confirmar a alteração de interesse. Com essa reação foram obtidos mutantes *glnB* Y51→F; L56→Q (vetor pDK6) e *glnB* Y51→F; Δ52 (vetor pTZ18R) e *glnZ* Y51→F (pTZ18R). Os plasmídeos foram denominados, respectivamente, pJIBD51, pJIB51Q e pJIZ51. A deleção de uma base no gene *glnB* mutante contido no plasmídeo pJIBD51 leva a mudança de fase de leitura

e portanto esse clone não será utilizado neste trabalho. A proteína GlnB mutante expressa pelo plasmídeo pJIB51Q apresenta a substituição do resíduo Leu56, que é altamente conservado em proteínas da família PII, impedindo que seja avaliado isoladamente o efeito da substituição de interesse (Y51-F). Este clone também não será utilizado neste trabalho.

FIGURA 6 - ESQUEMA PARA OBTENÇÃO DE MUTANTES SÍTIO DIRIGIDOS DOS GENES *glnB* E *glnZ* DE *A. brasilense*



3.8 SEQÜENCIAMENTO DE DNA

Ao DNA dupla fita purificada (0,5-1,0 µg) (item 4.5) foi acrescido 4µL de mistura para seqüenciamento ET mix (Amersham Biosciences) e 1 pmol de oligonucleotídeo reverso ou universal. Esta solução então foi submetida a uma reação de amplificação do DNA para seqüenciamento utilizando termociclador Perkin Elmer com a seguinte programação: _

etapa 1: 96°C 20seg

60°C 1min 30seg (30 ciclos)

O produto da reação de amplificação de DNA para seqüenciamento foi transferido para um tubo do tipo eppendorf e foram adicionados 6,67µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 68µL de etanol absoluto. Os tubos permaneceram em banho de gelo 15 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados (13.000 rpm, 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 450 µL de etanol 80%. Após centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado e o material seco a vácuo. A amostra foi desnaturada por 2 minutos a uma temperatura de 96°C e submetida à eletroforese em seqüenciador automático ABI377 (Applied Biosystems).

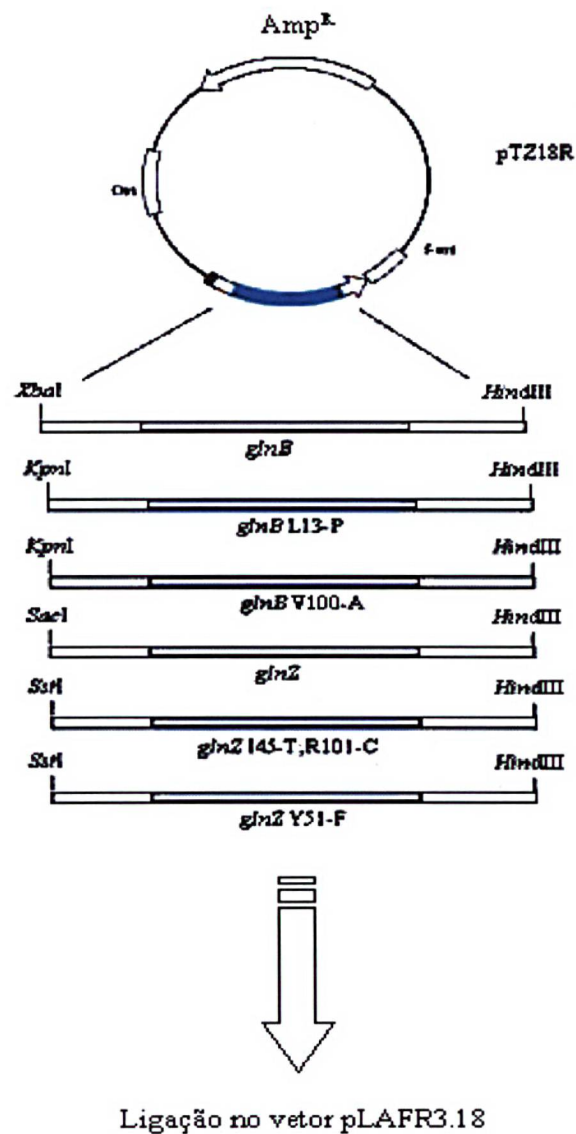
3.9 SUBCLONAGEM DOS GENES *glnB* E *glnZ* DE *A. brasilense* E SEUS MUTANTES

Os plasmídeos pLMA-2 e pMSA-2 contém, respectivamente, os genes *glnB* e *glnZ* clonados no vetor pTZ19R em orientação oposta ao promotor *plac*. Para que esses genes pudessem ser expressos a partir deste promotor, os plasmídeos pLMA-2 e pMSA-2 foram digeridos com as enzimas *KpnI/HindIII* (*glnB*) e *SacI/HindIII* (*glnZ*) e *DraI*, que cliva o vetor pTZ19R em diversos fragmentos, e ligados ao vetor pTZ18R digerido com as mesmas enzimas, de forma a gerar pontas coesivas. O produto de

ligação foi transformado em *E. coli* estirpe 71.18 e plaqueadas em meio MacConkey. As colônias obtidas tiveram o seu DNA plasmidial isolado e a clonagem foi confirmada através de digestão do DNA plasmidial com a enzima *Hind*III. Os clones selecionados foram seqüenciados para confirmar a orientação de *glnB* em relação a proteína LacZ .

Os plasmídeos pJI4 (contendo o gene *glnZ*), pLMA-2 (contendo o gene *glnB*), pJI6 (*glnB* L13→P), pJI9 (*glnB* V100→A), pJIZ-2 (*glnZ* I45→T , R101→C) e pJIZ51 (*glnZ* Y51→F) foram digeridos com as enzimas *Xba*I/*Hind*III (*glnB* selvagem), *Kpn*I/*Hind*III (*glnB* mutantes) ou *Sac*I/*Hind*III (*glnZ* e seus mutantes) e ligados ao vetor pLAFR3.18 digerido com as mesmas enzimas. O esquema de clonagem é apresentado na figura 7. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH10B e as colônias obtidas tiveram o seu DNA plasmidial isolado e a clonagem do inserto foi confirmada através de reação de amplificação utilizando os plasmídeos como molde e oligonucleotídeos que anelam na região N-terminal e C-terminal do gene *glnB* e *glnZ* (ARAÚJO, 2004 e ARAÚJO, 2004). O produto desta reação foi purificado e seqüenciado. Os clones obtidos foram denominados: pJI5 (*glnB*, pLAFR3.18), pJI1 (*glnZ*, pLAFR3.18), pJI10 (*glnB* L13→P, pLAFR3.18), pJI11 (*glnB* V100→A, pLAFR3.18), pJI13 (*glnZ* I45→T / R101→C, pLAFR3.18), pJIIZ51 (*glnZ* Y51→F, pLAFR3.18).

FIGURA 7 - ESQUEMA DE CLONAGEM DOS GENES *glnB* E *glnZ* E SEUS MUTANTES NOS VETORES pTZ18R E pLAFR 3.18



3.10 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

A conjugação interespecífica de bactérias foi realizada utilizando o sistema tríplice conforme descrito por Pedrosa e Yates (1984). Neste sistema, as estirpes de *A. brasilense* são as estirpes receptoras e as estirpes de *E. coli*, as doadoras. A estirpe S17.1 apresenta os genes de transferência de plasmídeos *tra*⁺ integrado ao seu cromossomo, que são responsáveis pela formação do “pilus” de conjugação bacteriano permitindo que o plasmídeo seja transferido por conjugação simples. Quando as estirpes doadoras foram DH5 α , 71.18 ou DH10B o método utilizado foi conjugação tríplice sendo necessária a participação de uma segunda estirpe de *E. coli*, que continha o plasmídeo pRK2013 que possui os genes *tra*.

E. coli estirpes DH5 α , 71.18, S-17 ou DH10B contendo os plasmídeos pJI5 (*glnB*), pJI1 (*glnZ*), pJI10 (*glnB* L13 \rightarrow P), pJI11 (*glnB* V100 \rightarrow A), pJI13 (*glnZ* T45 \rightarrow I/C101 \rightarrow R), pJIIZ51 (*glnZ* Y51 \rightarrow F), p2.3 (*nifHDK*::Tn5.B20) e pRK2013 (plasmídeo mobilizador, Tra⁺) foram crescidas em 2,5 ml de meio LB, a 37°C, sob rotação de 120 rpm, por 5 horas. Paralelamente, as estirpes de *A. brasilense* FP2, 7611, 7628 e 2812 foram crescidas em meio NFbHPN, conforme descrito a 30°C e 120 rpm, por 18 h. Um mililitro das culturas de *A. brasilense* foi misturado em tubos do tipo eppendorf com 100 μ L de cultura de *E. coli*. Os tubos foram centrifugados por trinta segundos. O sobrenadante foi retirado, mantendo-se aproximadamente 50 μ l do meio nos tubos. As células ressuspensas foram plaqueadas em meio NFbHPN/LA (1:1). As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. A massa de células formada foi coletada, transferida para eppendorf estéreis e ressuspensas em 1ml de meio NFbHPN e 100 μ l de diluição 10⁻² foram plaqueadas em meio NFbHPN com os antibióticos adequados. As placas foram incubadas a 30°C e as colônias obtidas foram coletadas.

3.11 ATIVIDADE DE NITROGENASE

A determinação da atividade de nitrogenase em *A. brasilense* foi realizada utilizando o método de redução de acetileno a etileno (DILK WORTH, 1966; SHOLLHORN & BURRIS, 1967; PEDROSA E YATES, 1984)

3.11.1 Atividade de Nitrogenase em Meio Líquido

Culturas de *A. brasilense* e seus transconjugantes foram crescidas em meio NFbHPN (20mmol/L NH_4Cl) por 48h em agitadores rotacionais a 120rpm e 30°C. Após este período, cerca de 100 μL de da cultura foram inoculadas em meio NFbHP contendo 1% de LB, em condições de desrepressão da nitrogenase (4mmol/L de NH_4Cl) e repressão da atividade da nitrogenase (20mmol/L) (MACHADO et al., 2001). As culturas foram mantidas em agitadores a 120 rpm e 30°C por 18h. Os frascos contendo as culturas foram selados com rolhas de borracha (subba-seal), acetileno gasoso foi injetado na cultura (10%do volume da fase gasosa) e os frascos foram incubados sob agitação, a 30°C por 30 min ou 1h. Amostras de 0,5mL de fase gasosa foram coletadas no tempo indicado para a determinação da formação de etileno através de cromatografia gasosa. O cromatógrafo utilizado foi Varian modelo 3400, equipado com coluna Porapak N e detector de ionização de chama. O gás de arraste foi o nitrogênio superseco (fluxo de 20 mL/min), a temperatura da coluna foi de 110°C e a do detector 200°C. Como padrão, foi utilizado etileno 100 ppm fornecido pela White Martins S/A.

A atividade específica da nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por minuto e por miligrama de proteína.

3.11.2 Atividade de Nitrogenase em Meio Semi-Sólido

Para a determinação da atividade de nitrogenase em meio semi-sólido 30 μ L de culturas saturadas de *A. brasilense* foram inoculadas em 4mL meio NFbHP semi-sólido, em frascos de 10mL. As culturas foram mantidas em estufa estática a 30°C e, após 24h, ou formação de películas de bactéria na superfície do meio de cultura, os frascos foram selados com rolhas de borracha e acetileno (10% da fase gasosa) foi injetado. As culturas foram incubadas por 30 min ou 1h e atividade de nitrogenase determinada.

3.12 DETERMINAÇÃO DO DESLIGAMENTO DA NITROGENASE EM *A. brasilense*

Uma cultura de *A. brasilense* foi inoculada em frascos de 60mL contendo 12 mL de meio NFbHP líquido acrescido de 4mmol/L de NH_4Cl e 1% de LB, a 120rpm, durante 18 horas (D.O._{600} entre 1,8 e 2,0). Os frascos foram então vedados com rolhas de borracha e neles foi injetado um volume de acetileno equivalente a 10% da fase gasosa.

Após 20 minutos, amostras do gás contido nos frascos (0,5 mL) foram coletadas e a redução do acetileno à etileno foi determinada através de cromatografia de fase gasosa. Após 40 min de injeção de acetileno, foram adicionados às culturas 200 μ mol/L ou 1mmol/L de NH_4Cl . Foram coletadas amostras de 0,5 mL nos tempos indicados e a produção de etileno determinada por cromatografia gasosa. Foi utilizado um cromatógrafo Varian 244DD equipado com coluna Porapak N e um detector de ionização de chama. O gás de arraste foi nitrogênio superseco (fluxo de 20 mL/min). A temperatura da coluna foi de 110° C e do detector 200° C. Como padrão, foi utilizado etileno padrão 100 ppm (White Martins).

3.13 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DEPENDENTE DE NITRATO EM *A. brasilense*

As estirpes de *A. brasilense* foram crescidas em meio NFbHPN e inoculadas com alça de platina em meio sólido NFBHP contendo como fonte única de nitrogênio 10 mM de KNO₃. As placas foram incubadas por 72h em estufa a 30°C e o crescimento foi avaliado visualmente. Em caso de ausência de crescimento, as placas foram incubadas a 30°C por até 96h para a confirmação do resultado.

3.14. DETERMINAÇÃO DA EXCREÇÃO DE AMÔNIO EM *A. brasilense*

Para a determinação de amônio excretado no meio por *A. brasilense*, 30 µL de culturas saturadas foram inoculadas em meio NFbHP líquido (5 mL) contendo como fonte de nitrogênio 10mmol/L de nitrato de potássio. Após 24h de crescimento, alíquotas foram coletadas, centrifugadas e a concentração de amônio foi determinada utilizando o método do indofenol conforme descrito por Chaney e Marbach (1962).

3.15 CAPTAÇÃO DE [¹⁴C] METILAMÔNIO EM *A. brasilense*

As células de *A. brasilense* foram crescidas em meio NFbHP contendo 20 mmol/L NH₄Cl (condição de excesso de nitrogênio) ou 0,5 mmol/L de glutamato (condições limitantes de nitrogênio) em banho a 30°C, com agitação recíproca de 120 rpm, até ser atingida D. O₆₀₀ de aproximadamente 1,2. Foram adicionados às culturas 10 µmol/L de [¹⁴C]metilamônio, análogo radioativo de amônio (atividade específica 0,546 µCi/mol). Amostras foram removidas em diferentes tempos (0; 2; 5; 10; 15 e 20 min), filtradas rapidamente (porosidade de 0.45 µm de diâmetro, membrana de nylon Hybond N+), lavadas cinco vezes com o meio NFbHP (100µL). A radioatividade intracelular foi medida em aparelho phosphorimage (Storm 820, Molecular Dynamics-

Amersham Bioscience) e os dados obtidos analisados pelo programa Image-Quant (Molecular Dynamics-Amersham Bioscience).

3.16 TRANSPORTE DE AMÔNIO EM *A.brasilense*

As células foram crescidas em meio NFbHP suplementado com 4 mmol/L NH_4Cl em banho a 30°C e agitação recíproca de 120 rpm. Após aproximadamente 18h e uma D.O₆₀₀ de aproximadamente 1.2, amostras foram coletadas e a ausência de amônio no meio verificada utilizando o método do indofenol (CHANEY & MARBACH, 1962). No tempo zero, foram adicionados ao meio de cultura (5mL) 200 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4Cl . Amostras (600 μL) foram removidas em diferentes tempos (0, 2, 5, 10 e 15 min), rapidamente centrifugadas e o sobrenadante coletado foi mantido em gelo até a determinação da concentração de amônio pelo método de indofenol (CHANEY & MARBACH, 1962).

3.17 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteína foi estabelecida utilizando o método de BRADFORD (1976), utilizando como padrão soro albumina bovina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização deste estudo, mutantes das proteínas GlnB e GlnZ foram obtidos e analisados. Para isso, duas técnicas de mutagênese foram utilizadas: a mutagênese aleatória e a mutagênese sítio-dirigida. A primeira visava a obtenção de mutantes aleatórios pontuais em toda a extensão da proteína, enquanto que a segunda visava a obtenção de mutantes específicos.

4.1 OBTENÇÃO DE FORMAS MUTANTES DOS GENES *glnB* E *glnZ* de *A. brasilense*

4.1.1 Mutagênese Aleatória

Para a obtenção de mutantes nos genes *glnB* e *glnZ* de *A. brasilense* foi utilizado um método de mutagênese por reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando $MnCl_2$ e baixa concentração de dNTP. Estas condições induzem a Taq DNA polimerase a erros de inserção de bases e, em média, produz uma modificação a cada 200-300 nucleotídeos em pelo menos 50% dos clones (LIN-GOERKE *et al.*, 1997). Assim, os fragmentos amplificados de aproximadamente 400 pb contém os genes *glnZ* e *glnB* com mutações pontuais.

A reação de PCR mutagênica foi realizada utilizando como molde o produto de uma reação de amplificação anterior, sob condições normais. Nesta reação foram utilizados os oligonucleotídeos universal e reverso que anelam especificamente a seqüências do vetor que flanqueiam os genes. As condições ótimas de amplificação foram inicialmente obtidas variando a concentração de DNA molde, oligonucleotídeos, temperatura e tempo de anelamento. Os produtos da amplificação consistiam de apenas

um fragmento de cerca de 350 pb. Cerca de 10 ng de cada fragmento (correspondente aos genes *glnB* e *glnZ*) foram utilizados como molde na PCR mutagênica. Os produtos de PCR obtidos (item 3.6) foram digeridos com as enzimas restrição *EcoRI* e *HindIII* (*glnB*) e *SacI/HindIII* (*glnZ*) e ligados ao vetor pTZ18R. Os clones foram selecionados e seqüenciados e as seqüências obtidas foram analisadas pelo programa BioEdit e BLAST 2.0 e alinhadas com os genes *glnB* e *glnZ* intactos de *A. brasilense*. Uma vez identificadas as alterações, os clones foram submetidos a um novo seqüenciamento no sentido reverso, para confirmar as alterações. Dos clones seqüenciados, um plasmídeo apresentou mutações que levaram a duas trocas de aminoácidos no gene *glnZ* de *A. brasilense* a isoleucina-45 foi substituída por uma treonina (I45-T) e a substituição do resíduo arginina-101 por uma cisteína (R101-C). Na primeira mutação, um aminoácido polar não carregado substituiu um aminoácido apolar. Na segunda mutação um aminoácido polar não carregado substituiu um aminoácido carregado positivamente. Esse plasmídeo foi denominado pJIZ2.

No alinhamento da seqüência obtida com a seqüência do gene *glnB* selvagem de *A. brasilense* foram identificados dois clones que continham trocas de bases. Em um dos clones houve a mutação do resíduo leucina 13 por uma prolina (L13-P), ou seja, um aminoácido polar não carregado substituiu um aminoácido apolar. Esse clone passou a se denominar pJI6. No segundo, ocorreu uma substituição do resíduo valina-100 por uma alanina (V100-A). Esse clone passou a ser denominado pJI9.

As mutações obtidas nesses clones podem provocar mudanças conformacionais na estrutura das proteínas ou mudanças na distribuição de cargas, podendo levar a alterações funcionais nas mesmas.

4.1.2 Mutagênese Sítio Dirigida

Os plasmídeo pMSA-2 contém o *glnZ* de *A. brasilense* clonado no vetor pTZ19R (ARAUJO et al., 2004). O plasmídeo pLMA-2 apresenta o gene *glnB* de *A. brasilense* fusionado a uma região que codifica para 6 resíduos de histidina na região N-terminal da proteína GlnB, clonados no vetor pTZ19R (ARAUJO et al., 2004). Esses genes encontram-se em posição oposta ao promotor do gene *lacZ* e como não possuem seus promotores próprios, não são expressos. Para a construção dos plasmídeos contendo os genes *glnB* e *glnZ* na mesma orientação do promotor *plac*, os plasmídeos pLMA-2 e pMSA-2 foram digeridos com as enzimas *EcoRI/HindIII* (*glnZ*) e *KpnI/HindII* (*glnB*) e ligados ao vetor pTZ18R cortado com as mesmas enzimas. Os clones gerados foram sequenciados para confirmar a orientação e a integridade dos genes. Os plasmídeos obtidos foram denominados pJI8 (contendo o gene *glnB*) e pJI4 (contendo o gene *glnZ*).

O resíduo tirosina-51 é altamente conservado entre as proteínas PII e é o sítio de uridililação dessas proteínas em resposta às variações da concentração de amônio intracelular. Para estudar o efeito da uridililação nas proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense*, mutantes contendo a substituição desse resíduo por uma fenilalanina (Y51-F) foram construídos. Para a obtenção dos mutantes, os plasmídeos pJI4 e pJI8 foram utilizados como molde numa reação em cadeia da polimerase, utilizando a metodologia descrita no item 3.7 da seção Materiais e Métodos, conhecida como *megaprimer*.

Comparando-se a seqüência obtida de um plasmídeo com a do gene selvagem de *A. brasilense* foi confirmada a presença da mutação no gene *glnZ*, que substituiu a tirosina-51 por fenilalanina. O plasmídeo passou a se chamar pJIZ51. Para o gene *glnB*, o gene apresentou além da alteração mutação Y51-F, a alteração leucina-56 por glutamina (L56-Q). Como o resíduo L-56 é conservado nas proteínas GlnB de diferentes organismos, esse mutante não será utilizado para avaliarmos o efeito do resíduo Y51, uma vez que essa segunda alteração pode alterar a estrutura da região de uridililação dessa proteína.

4.2 CLONAGEM DOS GENES *glnB*, *glnZ* E SEUS MUTANTES NO VETOR pLAFR3.18

Os genes *glnB*, *glnZ* e seus derivados mutantes foram clonados em vetor pLAFR3.18, para utilização nos ensaios de fisiologia, devido à estabilidade deste vetor em *A. brasilense*. Para isso, o gene *glnB* foi isolado a partir do vetor pLMA-2 por digestão com as enzimas *XbaI/HindIII*. Os genes *glnZ* e *glnZ* mutagenizados aleatoriamente (item 3.6), foram isolados a partir de restrição dos plasmídeos pMSA-2 e pJIZ2 (*glnZ* T45-I; R101-C) com as enzimas *SstI/HindIII*, e dos plasmídeos pJI6 (*glnB* L13-P) e pJI9 (*glnB* V100-A) com as enzimas *KpnI/HindIII*. Os fragmentos purificados foram ligados ao pLAFR3.18 e os produtos de ligação foram transformados em *E. coli* 71.18.

Para confirmar a presença dos insertos contendo o gene *glnB*, *glnZ* e seus derivados, foi realizada uma reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos que anelam às seqüências de bases no vetor que flanqueiam o inserto e os plasmídeos utilizados como moldes. A presença do produto de amplificação do plasmídeo recombinante de tamanho de aproximadamente 450 pares de bases confirmou a clonagem.

Os plasmídeos recombinantes foram transferidos para as estirpes de *A. brasilense* selvagem e seus mutantes para estudar o efeito das proteínas GlnB e GlnZ mutantes na fixação e metabolismo de nitrogênio.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES GlnB E GlnZ *A. brasilense*

As proteínas mutantes obtidas foram ensaiadas *in vivo* em *A. brasilense*.

4.3.1 Atividade de Nitrogenase

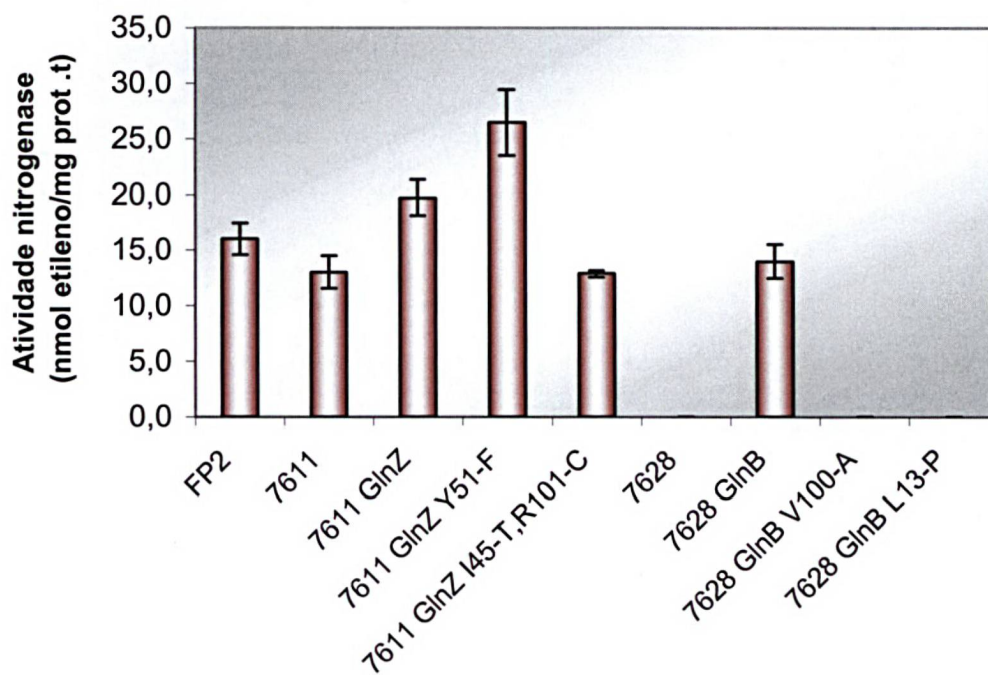
Como sugerido anteriormente, as proteínas do tipo PII em *A. brasilense* estão envolvidas no metabolismo de nitrogênio. Para avaliar o efeito das proteínas GlnB

selvagem, GlnZ selvagem, GlnB V100-A, GlnB L13-P, GlnZ I45-T; R101-C e GlnZ Y51-F em *A. brasilense*, a atividade de nitrogenase foi avaliada nas estirpes selvagem (FP2), mutante 7611 (mutante *glnZ*), 7611 contendo o plasmídeo pJI1 (expressa GlnZ, *plac*), 7611 contendo o plasmídeo pJI13 (expressa GlnZ I45-T;R101-C, *plac*), 7611 contendo o plasmídeo pJILZ51 (expressa GlnZ Y51-F, *plac*), 7628 (mutante *glnB*), 7628 contendo o plasmídeo pJI5 (expressa GlnB, *plac*), 7628 contendo o plasmídeo pJI10 (expressa GlnB L13-P, *plac*), 7628 contendo o plasmídeo pJI11 (expressa GlnB V100-A, *plac*).

A figura 9 mostra a atividade de nitrogenase dos transconjugantes obtidos. A estirpe selvagem (FP2) apresentou uma atividade de nitrogenase de 16 nmol de etileno . mg prot⁻¹. min⁻¹. A estirpe 7611 apresentou uma atividade de nitrogenase equivalente a 13 nmol de etileno . mg prot⁻¹. min⁻¹, enquanto que a estirpe 7611 pJI1 (expressando GlnZ nativa) apresentou uma atividade de 19,7 nmol de etileno . mg prot⁻¹. min⁻¹. A estirpe 7611 pJILZ51, expressando a proteína GlnZ Y51-F, apresentou a maior atividade (26,5 nmol de etileno . mg prot⁻¹. min⁻¹). Entretanto, a estirpe mutante que expressa a proteína GlnZ I45-T; R101-C apresentou atividade inferior à estirpe selvagem e semelhante à estirpe 7611 (12,9 nmol de etileno . mg prot⁻¹. min⁻¹).

A estirpe mutante *glnB* (7628) é incapaz de fixar nitrogênio (DE ZAMAROCZY et al.,1998). No experimento realizado, esse fenótipo foi reproduzido. A expressão da proteína GlnB pelo plasmídeo pJI5 complementou esse fenótipo, resultando em uma atividade de 14 nmol de etileno . mg prot⁻¹. min⁻¹, similar a estirpe selvagem FP2. Entretanto, as estirpes expressando as proteínas mutantes GlnB V100-A e GlnB L13-P foram incapazes de fixar nitrogênio tanto quando testadas em meio sólido, quanto em meio semi-sólido, mostrando que a substituição desses aminoácidos leva a total inativação da proteína GlnB na função avaliada. Como a ativação de transcrição dos genes relacionados com a síntese da nitrogenase depende da ativação de NifA por GlnB, os resultados sugerem que as proteínas mutantes são incapazes de ativar NitA.

FIGURA 9 - EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnB, GlnZ E SEUS MUTANTES NA ATIVIDADE DA NITROGENASE DE ESTIRPES DE *A. brasilense*



Atividade de nitrogenase das estirpes FP2 (selvagem), 7611 (mutante *glnZ*), 7611 GlnZ (contendo o plasmídeo pJI1), 7611 GlnZ Y51-F (contendo o plasmídeo pJIIZ51), 7611 GlnZ-I45-T,R101-C (contendo o plasmídeo pJI13), 7628 (mutante *glnB*), 7628 GlnB (contendo o plasmídeo pJI5), 7628 GlnB V100-A (contendo o plasmídeo pJI11), 7628 GlnB-P (contendo o plasmídeo pJI10). As médias obtidas resultam de três experimentos independentes, as barras indicam os desvios obtidos.

4.3.2 Desligamento/Religamento da Nitrogenase em *A. brasilense*

Em *Azospirillum brasilense* a atividade da nitrogenase é controlada covalentemente por íons amônio (HARTMANN et al., 1985). A adição de NH_4^+ às células desreprimidas para a nitrogenase produz o desligamento (*switch-off*) da nitrogenase, devido a ADP-ribosilação de uma das subunidades da proteína Fe, mediada pelo sistema DRAT/DRAG (ZHANG et al., 1993). Em *A. brasilense* foi demonstrado que a proteína GlnB está envolvida no desligamento da nitrogenase (KLASSEN et al., submetido), e que a proteína GlnZ é necessária para que ocorra a reativação da atividade da nitrogenase (KLASSEN et al., 2001). Assim, esse processo provavelmente envolve a sinalização pelas proteínas GlnB e GlnZ às proteínas DraT e DraG, respectivamente. Para tentar determinar a participação das proteínas e o envolvimento de GlnZ na sinalização para o sistema de desligamento/religamento da nitrogenase, a atividade da proteína mutante obtida foi testada em *A. brasilense*. A atividade da nitrogenase foi determinada pela taxa de redução de acetileno a etileno em culturas crescidas em meio líquido desreprimidas na ausência de nitrogênio fixado (DILWORTH, 1966; ZHANG et al., 1993).

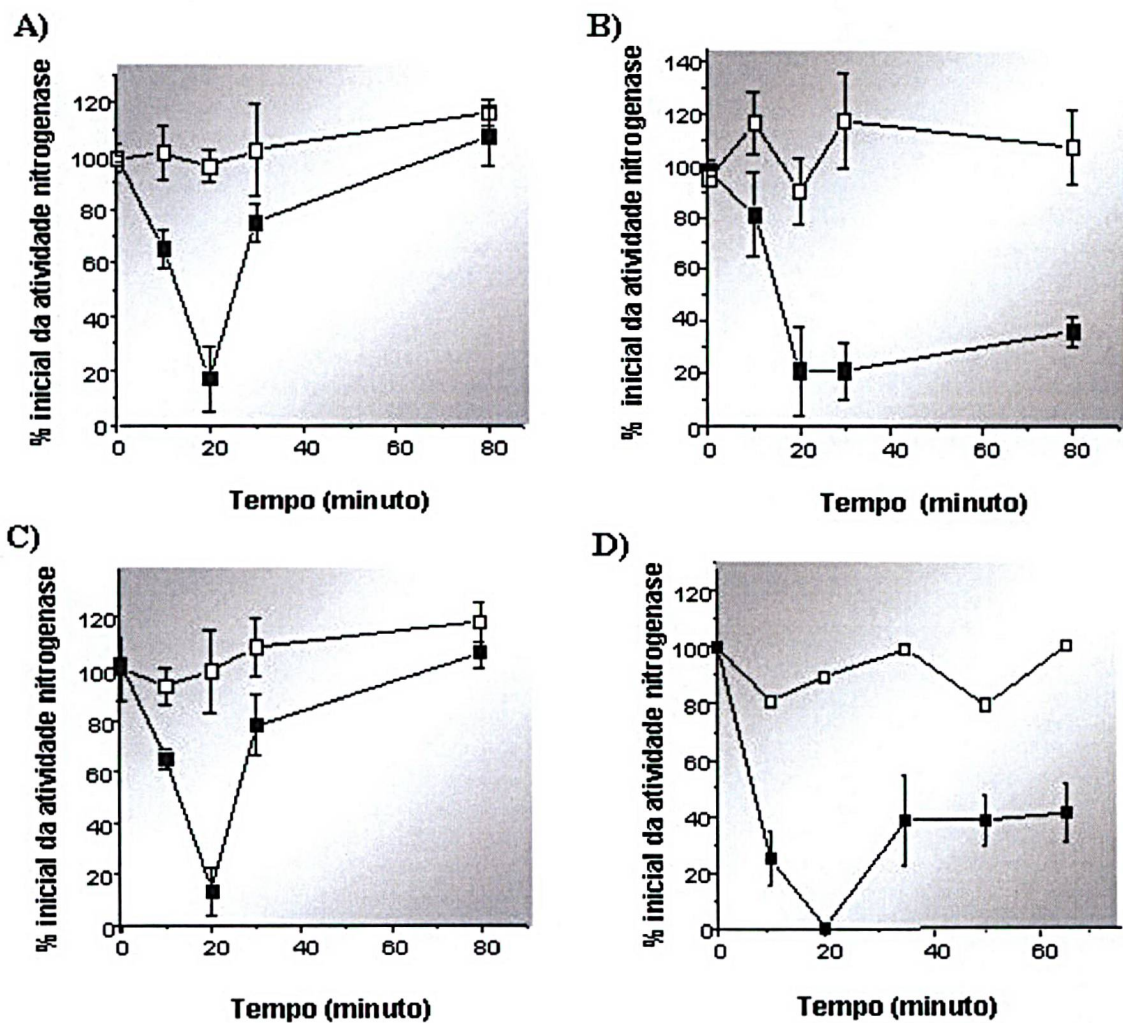
4.3.2.1 Efeito da proteína GlnZ Y51-F no desligamento/religamento da nitrogenase por adição de íons amônio

O perfil de desligamento e religamento da nitrogenase foi avaliado na estirpe mutante *glnZ* (7611) expressando a proteína GlnZY51-F. A figura 10 mostra que a adição de 0,2 mmol/L de amônio a culturas desreprimidas de *A. brasilense* estirpe selvagem FP2 (A) levou a total inativação da nitrogenase. Após aproximadamente 30 minutos, ocorreu uma recuperação da atividade de nitrogenase. Ao contrário da estirpe selvagem, a estirpe 7611 expressando a proteína GlnZY51-F (D) é capaz de recuperar somente 40% da

atividade inicial e, mesmo após 60 minutos, a atividade da enzima não voltou aos níveis iniciais. Este perfil foi semelhante ao da estirpe mutante *glnZ* (7611) (B).

Após a adição de amônio a cultura desreprimida, a enzima DraT é temporariamente ativada e DraG inativada, o que leva à transferência de um grupamento ADP-ribosil à nitrogenase, inativando-a. Com o consumo dos íons amônio, a DraT perde a atividade e DraG é reativada removendo o grupamento ADP-ribosil da nitrogenase. Klassen et al. (2001) sugeriram que a proteína GlnZ é necessária para a reativação da DraG após o choque de amônio em *A. brasilense*. O choque de amônio leva à desuridililação das proteínas PII. Com o consumo do mesmo, as proteínas PII são uridililadas no resíduo Y51. Como a proteína GlnZY51F não pode ser uridililada após consumo dos íons amônio, este resultado indica que uridililação de GlnZ é importante para sinalizar ao sistema DraT/DraG à volta das condições de fixação de nitrogênio após o choque e consumo de amônio. Uma interpretação alternativa é a persistência da atividade de DraT após o consumo de NH_4^+ ; neste caso a uridililação de GlnZ seria necessária para a sinalização para DraT. Os resultados sugerem também que a uridililação de GlnZ não é essencial para a ativação de DraT, uma vez que ocorre inativação da nitrogenase após adição de íons amônio.

FIGURA 10- EFEITO DA PROTEÍNA GlnZ Y51-F NO DESLIGAMENTO E RELIGAMENTO DA NITROGENASE POR ADIÇÃO DE ÍONS AMÔNIO EM *A. brasilense*



No tempo zero 0,2 mmol/L de cloreto de amônio foi adicionados às culturas desreprimidas de *A. brasilense* e a atividade de nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno. A) Estirpe selvagem FP2; B) estirpe mutante *glnZ* (7611); C) 7611 pJI1 (expressa GlnZ selvagem); D) 7611 pJIIZ51 (expressa GlnZ Y51-F). Os valores são médias de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio padrão. A atividade máxima de nitrogenase foi de aproximadamente 28 nmol etileno⁻¹. mg prot⁻¹.

4.3.2.2 Efeito da proteína GlnZ I45-T, R101-C no desligamento/religamento da nitrogenase por adição de íons amônio

Para avaliar o envolvimento dos resíduos Ile-45 e Arg-101 da proteína GlnZ no religamento da nitrogenase após adição e consumo de íons amônio, as culturas de *A. brasilense* estirpe selvagem (FP2), mutante *glnZ* (7611) e mutante *glnZ* contendo o plasmídeo pJI13 (expressa GlnZ I45-T; R101-C) tiveram o seu perfil de desligamento/religamento da nitrogenase testados

A figura 11 mostra que o GlnZ I45-T; R101-C complementou parcialmente o fenótipo da estirpe 7611 (D). A adição de íons amônio às culturas de *A. brasilense* estirpe selvagem (A) causou a inativação de aproximadamente 80% da atividade de nitrogenase em aproximadamente 20 minutos. Trinta minutos após a adição de íons amônio, a estirpe selvagem recuperou 80% da atividade da nitrogenase. A figura mostra que a atividade de nitrogenase da estirpe que expressa GlnZ I45-T;R101-C foi inativada e posteriormente recuperada, mas a cinética do processo foi substancialmente alterada. A atividade de nitrogenase nesta estirpe foi completamente recuperada apenas 80 minutos após o choque de amônio. Por outro lado, nenhuma atividade de nitrogenase foi observada na estirpe 7611 expressando a proteína mutante GlnZ I45-T;R101-C, 30 minutos após a adição de amônio; e mesmo 65 minutos depois, apenas 20% da atividade inicial estava presente. Este perfil difere também daquele do mutante 7611 (B), onde a atividade não foi recuperada mesmo 80 minutos após a adição de íons amônio, sugerindo uma alteração na sinalização para o sistema DraT/DraG. Uma vez que DraG parece ser o alvo de GlnZ, os resíduos mutagenizados na proteína GlnZ I45-T;R101-C, portanto, podem estar envolvidos nesta interação.

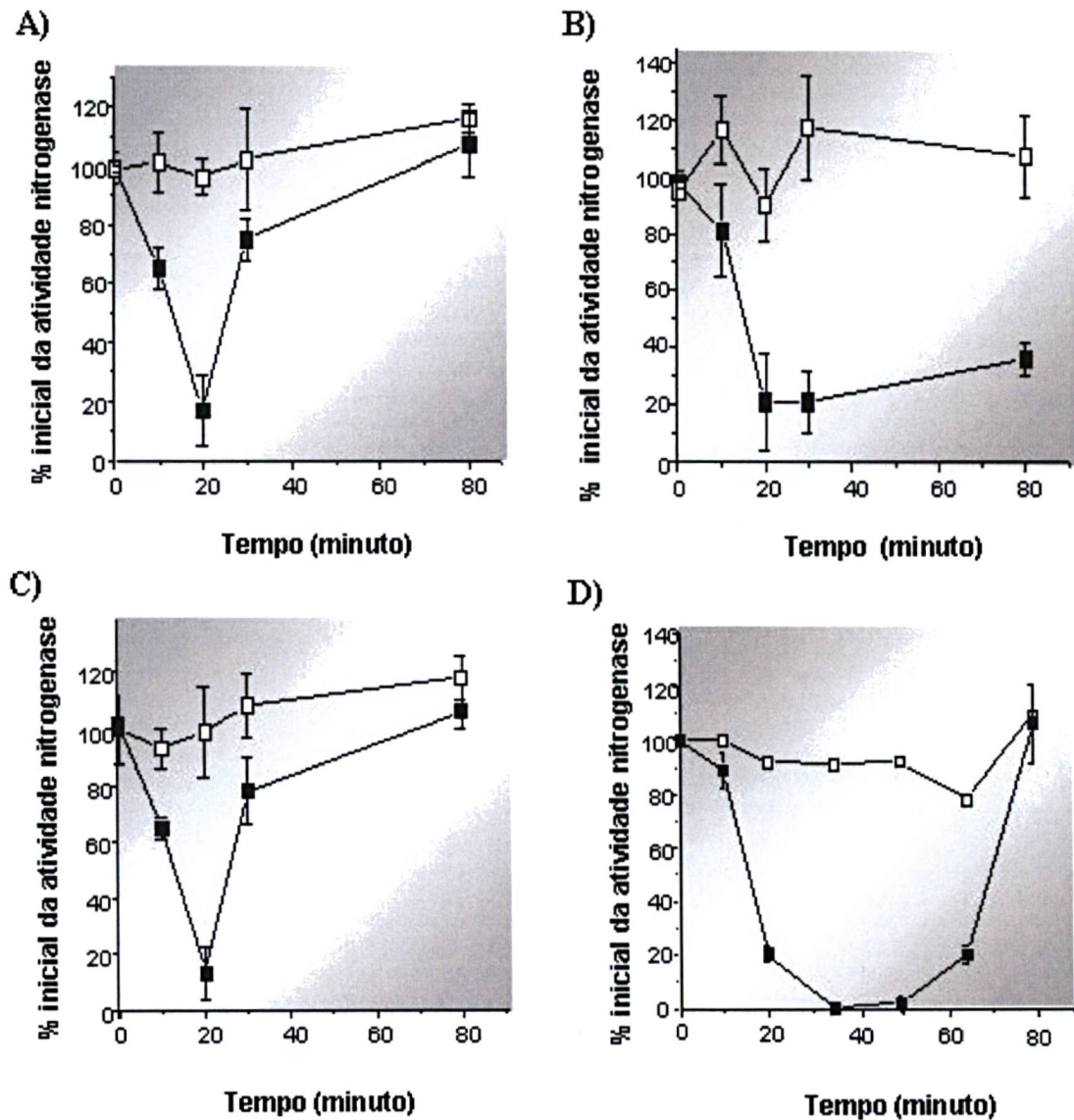
O resíduo Arg101 é altamente conservado nas proteínas tipo PII, sugerindo sua participação nos processos de sinalização. A região compreendida entre os resíduos 102 a 105 constitui a chamada alça C (CHEAH et al., 1994; de MEL et al., 1994; CAPR et al 1996). Recentemente, foi mostrado que esta região da proteína GlnB de *H. seropedicae*

está envolvida com a interação com NifL-NifA de *K. pneumoniae* (BONATTO et al., 2005) e, na proteína GlnB de *R. rubrum*, esta envolvida com a sinalização para a proteína NifA (ZHANG et al., 2004).

A posição 45 de proteínas PII possui os resíduos apolares de cadeia grande leucina, isoleucina ou valina (figura 12), sugerindo sua importância para a função destas proteínas. Estudos de cristalização da proteína GlnB de *E. coli* (CHEAH et al., 1994; de MEL et al., 1994; CARR et al 1996) mostraram que a região que envolve os resíduos 37 ao 55 compreende a alça T, sítio de uridililação nessa proteína (CHEAH et al., 1994). O resíduo Ile45 está localizado nesta alça e encontra-se ao lado do resíduo Tyr46 que é altamente conservado nas proteínas da família PII de vários organismos (Figura 12). Esse resíduo parece estar envolvido na ligação da proteína GlnD, responsável pela uridililação das proteínas PII em baixos níveis de amônio (JAGGI et al., 1996; JIANG et al., 1997). Substituições na região da alça B e na base da alça T em GlnB de enterobactérias afeta a interação com pequenas moléculas ligantes e com as proteínas GlnD, GlnE, NifL e NtrB (JIANG et al., 1997; ARCONDÉGUY, LAWSON e MERRICK, 2000; JAGGI et al., 1996). É interessante notar que mutações nos resíduos 43 e 54 da proteína GlnB de *K. pneumoniae* permite a sua interação com o complexo NifL-NifA, função específica da proteína GlnK nativa de *K. pneumoniae* (ARCONDÉGUY, LAWSON e MERRICK, 2000).

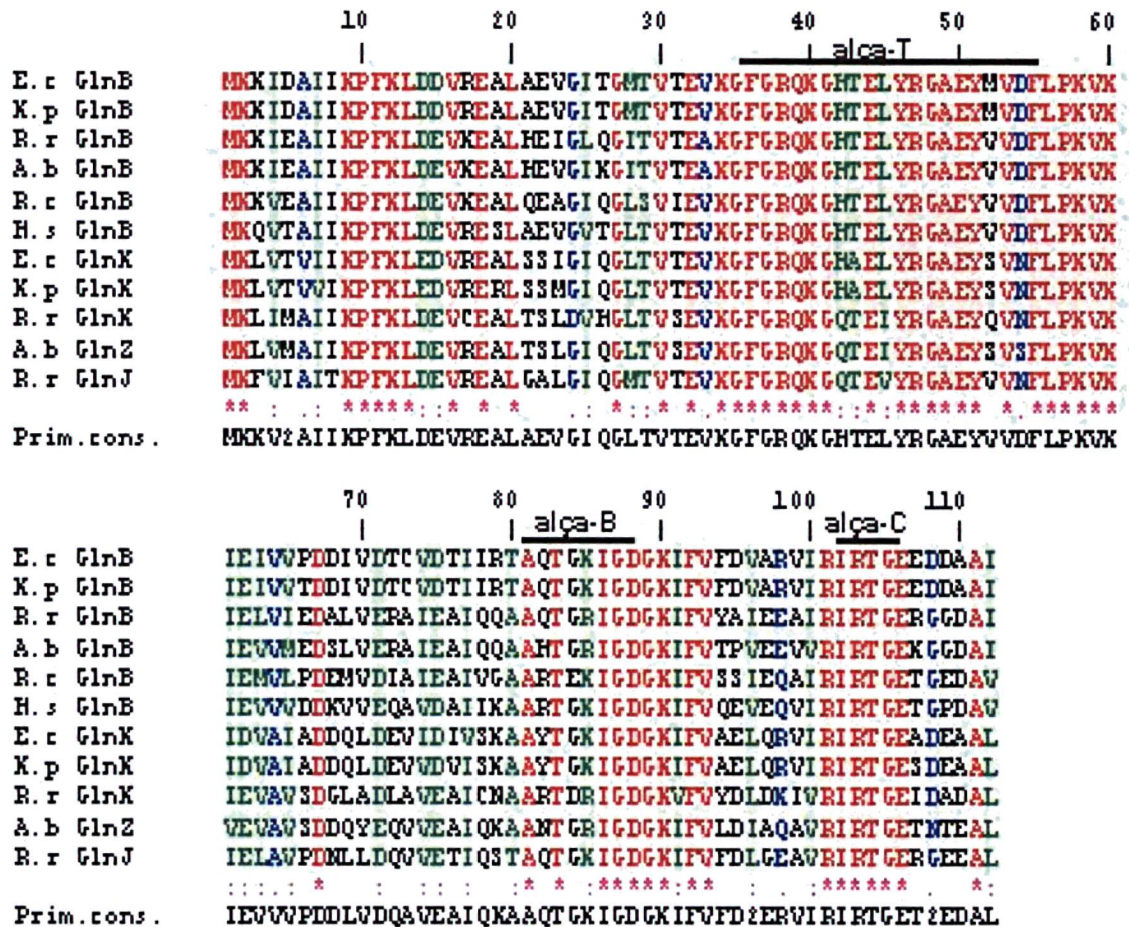
Os resultados descritos aqui apoiam a conclusão de que os resíduos 45 e 101 são importantes para a transdução de sinal dos níveis de nitrogênio intracelular, efetuada pela proteína GlnZ.

FIGURA 11- EFEITO DA PROTEÍNA GlnZ I45-T, R101-C NO DESLIGAMENTO E RELIGAMENTO DA NITROGENASE POR ADIÇÃO DE ÍONS AMÔNIO EM ESTIRPES DE *A. brasilense*



No tempo zero 0,2 mmol/L de cloreto de amônio foram adicionados às culturas desreprimidas de *A. brasilense* e a atividade de nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno. A) Estirpe selvagem FP2; B) estirpe mutante *glnZ* (7611); c) 7611 pJI1 (expressa GlnZ selvagem); D) 7611 pJI3 (expressa GlnZ I45-T, R101-C). Os valores são médias de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio padrão. A atividade máxima de nitrogenase foi de aproximadamente 19 nmol etileno⁻¹. mg prot⁻¹.

FIGURA 12 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII



Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas do tipo PII encontradas em *E. coli* (*E. c.*), *K. pneumoniae* (*K. p.*) *Rhodospirillum rubrum* (*R. r.*), *Azospirillum brasilense* (*A. b.*) *Rhodobacter capsulatus* (*R. c.*). O alinhamento das seqüências de aminoácidos foi realizado pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994). Os asteriscos identificam aminoácidos idênticos, dois pontos indicam aminoácidos de alta similaridade e um ponto mostra a presença de baixa similaridade entre os aminoácidos. As alça B, alça C e alça T são identificadas por barras negras sobre as seqüências.

4.3.2.3 Efeito da inativação do gene *amtB* sobre a regulação da atividade de nitrogenase de *A. brasilense*

Em contraste com vários organismos, em *A. brasilense* o gene *amtB* não forma um operon com o gene *glnK* (VAN DOMMELEN et al., 1998). Embora os genes *amtB* e *glnZ* de *A. brasilense* não estejam fisicamente próximos, a mutação no gene *glnZ* afeta a taxa de captação de metilamônio: o mutante *glnZ* tem uma taxa de captação de metilamônio cerca de 2 vezes maior do que a estirpe selvagem (DE ZAMAROCZY et al., 1998). O mutante *amtB* de *A. brasilense* não é capaz de transportar metilamônio, mas é capaz de fixar nitrogênio e possui atividade de nitrogenase semelhante à da estirpe selvagem (VAN DOMMELEN et al., 1998).

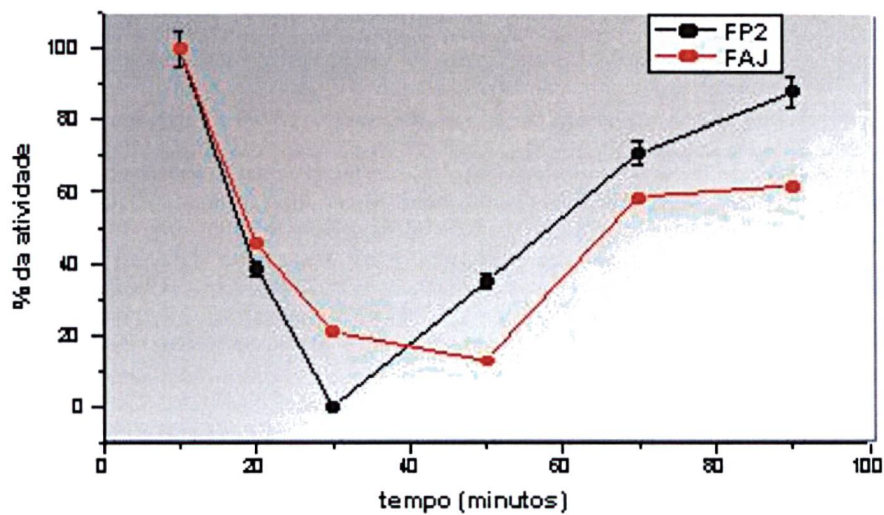
Resultados recentes mostraram que a proteína GlnK de *E. coli* (provável ortóloga de GlnZ de *A. brasilense*) controla a atividade do transportador de amônio AmtB de *E. coli*, estabelecendo uma ligação entre o transporte de íons amônio e proteínas PII (COUTTS et al., 2002). Na tentativa de verificar alguma relação entre GlnZ e AmtB em *A. brasilense*, o efeito do desligamento/religamento da nitrogenase por adição de íons amônio foi avaliado na estirpe FAJ310 que apresenta o gene *amtB* inativado.

A figura 13 mostra que na estirpe mutante FAJ310 (mutante *amtB*) a inativação da nitrogenase 20 minutos após a adição de NH_4^+ foi incompleta (a atividade remanescente foi maior que 20%) e que a cinética de inativação e reativação da nitrogenase são visivelmente mais lentas. Finalmente, 100 minutos após a adição de íons amônio a recuperação máxima foi de aproximadamente 60% da atividade inicial.

A explicação para o efeito observado é que a ausência do transportador de amônio AmtB causa uma diminuição da taxa de captação dos íons amônio em concentrações da ordem de micromols por litro. Este atraso resultaria em um retardamento da inativação da nitrogenase. Dommeilen et al. (1998) sugeriram que além do transportador AmtB existia um segundo mecanismo de transporte de NH_4^+ , porém de baixa afinidade. Este suposto

sistema teria, portanto, baixa atividade em concentrações micromolares e ineficiente para ativar a ADP ribosilação rapidamente.

FIGURA 13 - EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE DE NITROGENASE EM *A. brasilense* ESTIRPE FAJ (MUTANTE *amtB*)



No tempo zero 0,2 mmol/L de cloreto de amônio foram adicionados às culturas desreprimidas de *A. brasilense* e a atividade de nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno. Os valores são médias de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio padrão. A atividade máxima de nitrogenase (100%) foi de aproximadamente 20 nmol etileno.min⁻¹.mg proteina⁻¹

4.3.3 Taxa de Captação de Íons Amônio em *A. brasilense*

De Zamaroczy (1998) mostrou que as proteínas GlnZ e GlnB participam do sistema de regulação da captação de metilamônio, extrapolando seus resultados para a captação de amônio. Para confirmar se esse dado pode ser realmente extrapolado para o transporte de amônio, as estirpes selvagem (FP2), 7611 (mutante *glnZ*), 7611 expressando a proteína GlnZ (pJI1), 7611 expressando a proteína mutante GlnZ Y51-F (pJILZ51) e duplo mutante 2812 (*glnBglnZ*) tiveram a sua taxa de transporte de amônio foram determinadas. As culturas foram crescidas em condições de desrepressão da nitrogenase e no tempo zero foram adicionados 0,2 mmol/L de amônio às culturas.

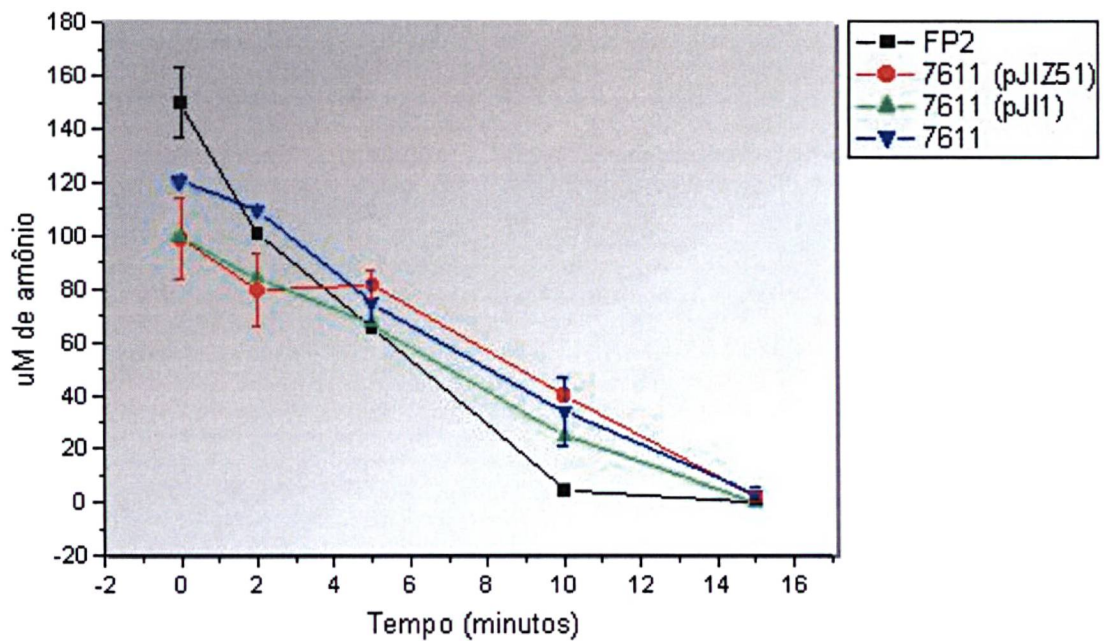
Os resultados apresentados na figura 14 mostram que a estirpe selvagem FP2 consome todo o amônio adicionado (0,2 mmol/L) após 15 minutos. O mesmo resultado foi obtido utilizando o mutante *glnZ* (7611) contendo o plasmídeo pJI1. A inclinação das duas curvas foi a mesma, indicando que a taxa de transporte nas condições utilizadas é a mesma. Para avaliar se o estado de uridililação de GlnZ exerce influência no transporte de amônio, a taxa de captação de amônio na estirpe 7611 contendo o plasmídeo pJILZ51 (*glnZY51-F*) foi determinada (Figura 14). Nenhuma diferença em relação à estirpe selvagem FP2, mutante *glnZ* ou à estirpe expressando GlnZ selvagem de *A. brasilense* foi observada. Klassen e colaboradores (submetido, 2005) verificaram que a estirpe mutante *glnB* não apresenta modificações no transporte de amônio quando comparado à estirpe selvagem FP2.

A falta de efeito da mutação em *glnZ* ou *glnB* sobre o transporte de amônio poderia ser devido a uma complementação funcional pela proteínas parálogas respectivas, já que estas proteínas têm cerca de 85% de similaridade. Para excluir esta possibilidade a taxa de captação de amônio da estirpe duplo mutante *glnB glnZ* (2812) foi determinada nas mesmas condições. A figura 15 mostra que esta estirpe é capaz de captar os íons amônio adicionados às culturas com taxa comparável àquela da estirpe selvagem FP2 ou das estirpes mutantes simples.

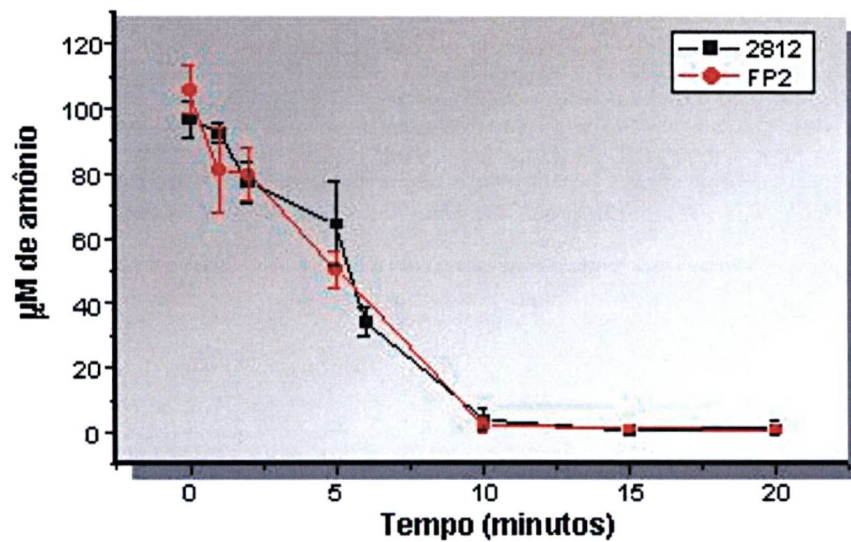
Os resultados obtidos sugerem que nem GlnZ nem GlnB exercem efeito sobre o sistema de transporte de amônio de *A. brasilense* nas condições testadas, sugerindo que os dados de transporte de metilamônio não podem ser extrapolados para o transporte de amônio. É importante notar que variações das concentrações de amônio na faixa de 5-50 $\mu\text{mol/L}$ são suficientes promover o seqüestro de GlnK do citoplasma por AmtB (JAVELLE et al., 2004). As concentrações de amônio empregadas nesse experimento são maiores do que essas concentrações, provavelmente chegando a ocorrer a captação de amônio pelo segundo mecanismo de transporte de baixa afinidade proposto por Dommelen et al., (1999) ou por simples difusão de amônio na forma não carregada de NH_3 .

O método de determinação de concentração de amônio permite a detecção de no mínimo 20 $\mu\text{mol/L}$ (CHANEY & MARBACH), o que torna impossível determinar inequivocamente participação de GlnZ ou GlnB na captação de amônio de baixíssimas concentrações.

FIGURA 14 - EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnZ E GlnZ Y51-F NO TRANSPORTE DE AMÔNIO EM ESTIRPES DE *A. brasilense*



No tempo zero foram adicionados 0,2 mmol/L de cloreto de amônio às culturas desreprimidas. As amostras coletadas foram imediatamente centrifugadas e a concentração de amônio no sobrenadante foi determinada pelo método de Indofenol. Os valores são médias de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão. O plasmídeo pJI1 expressa a proteína GlnZ selvagem e o plasmídeo pJILZ51 expressa a proteína mutante GlnZ Y51-F.

FIGURA 15 - EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnZ NO TRANSPORTE DE AMÔNIO EM ESTIRPES DE *A. brasilense*

No tempo zero foram adicionados 0,2 mmol/L de cloreto de amônio às culturas desreprimidas. As amostras coletadas foram imediatamente centrifugadas e a concentração de amônio no sobrenadante foi determinada pelo método de Indofenol (CHANEY e MARBACH, 1962). Os valores são médias de três experimentos independentes e as barras indicam o desvio padrão.

4.3.4 Taxa de Captação de Metilamônio

Na tentativa de refinar os dados obtidos por de ZAMAROCZY (1998) e de verificar se a participação da proteína GlnZ na captação de metilamônio é dependente do seu estado de uridililação ou dos resíduos I45 e R101 de GlnZ, culturas de *A. brasilense* estirpe FP2 (selvagem), 7611 (mutante *glnZ*), 7611 pJILZ51 (expressa GlnZ Y51-F) e 7611 pJI13 (expressa GlnZ I45-T;R101-C) tiveram o seu transporte de metilamônio determinado.

A figura 16 mostra que na estirpe selvagem a taxa de captação de metilamônio foi cerca de 5-7 vezes maior quando cultivada em condições de desrepressão, do que na presença de excesso de íons amônio. Este resultado é suportado por trabalhos anteriores que mostraram que a expressão do captador de metilamônio é inibida na presença de amônio (HARTMANN et al., 1984; VAN DOMMELEN et al 1998).

A estirpe mutante 7611 (*glnZ*) apresentou taxa de transporte de amônio aproximadamente 2 vezes maior do que a da estirpe selvagem, como já relatado por de ZAMAROCZY (1998). Este fenótipo foi complementado pelo plasmídeo pJI1 expressando a proteína GlnZ selvagem. A pequena diferença na taxa de captação de metilamônio entre a estirpe selvagem e a estirpe 7611 pJI1 provavelmente é devida a uma combinação de dosagem gênica (existem 2-5 cópias do vetor pLAFR318 por cada cópia de cromossoma).

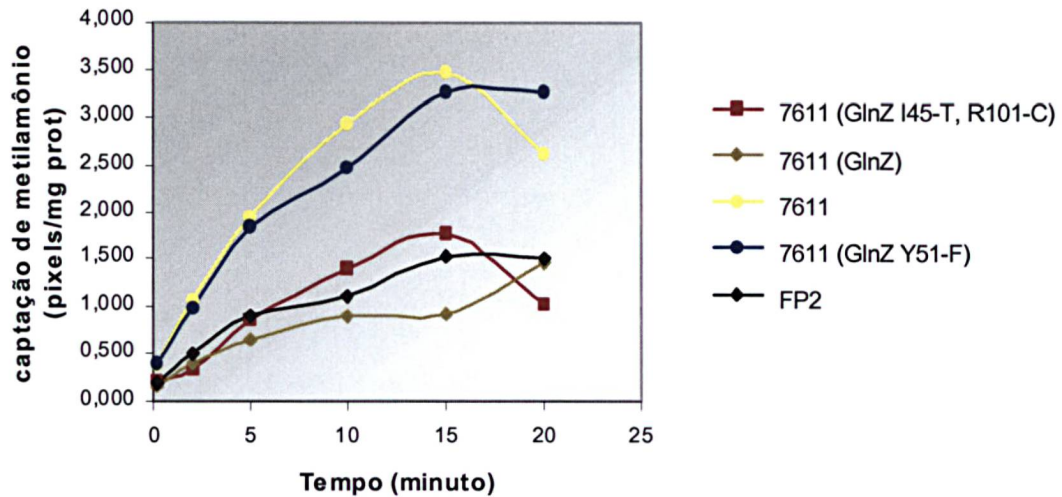
A estirpe 7611 expressando a proteína GlnZ I45-T, R101-C possui essencialmente a mesma taxa de captação de metilamônio que a estirpe selvagem ou 7611pJI1 (expressa GlnZ), indicando que GlnZ I45-T,R101-C é capaz de complementar o fenótipo de captação de amônio do mutante *glnZ*. Estes resultados sugerem que o fenótipo de *switch-off/switch-on* da nitrogenase da estirpe 7611 pJI13 provavelmente é devido a interação da proteína mutante com a proteína DraG e não com AmtB.

O controle do transportador de metilamônio na estirpe 7611 não é complementado pela proteína mutante GlnZY51-F. Em *E. coli*, GlnK atua como regulador da atividade de

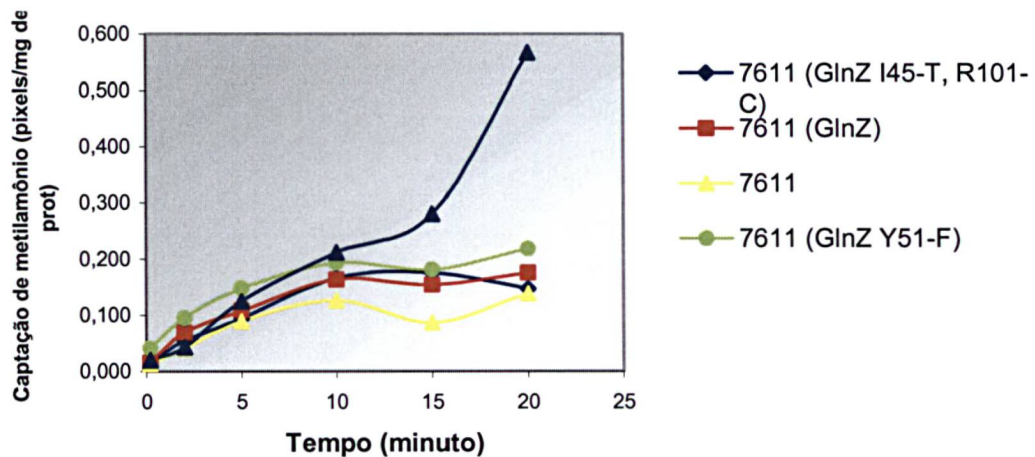
AmtB. A proteína GlnK não uridililada liga-se a transportador AmtB, inibindo sua atividade. Este efeito é absolutamente depende da uridililação de GlnK (COUTTS et al., 2002). Os resultados mostrados aqui indicam que a proteína GlnZ atua de forma similar a GlnK de *E. coli* controlando a atividade de AmtB. Este controle depende da desuridililação reversível de GlnZ pela proteína GlnD e que o possível seqüestro de GlnZ por AmtB ligado à membrana seja um fator essencial para o controle da atividade do sistema DraT/DraG.

FIGURA 16: EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnZ E DERIVADAS NO TRANSPORTE DE METILAMÔNIO EM *A. Brasilense*

A)



B)



As culturas de *A. brasilense* foram crescidas em meio NFbHP contendo 5mM de glutamato (A), ou NFbHP contendo 20 mmol/L de amônio (B). No tempo zero foram adicionados 10 μ mol/L de [¹⁴C] metilamônio (atividade específica 0,546 μ Ci/mol). Amostras foram removidas nos diferentes tempos indicados. A radioatividade intracelular foi medida em aparelho phosphorimager (Storm 820 Molecular Dynamics- Amersham Biosciences).

4.3.5 Utilização de Nitrato como Fonte de Nitrogênio

A capacidade de crescimento utilizando nitrato como única fonte de nitrogênio das estirpes 7628 (mutante *glnB*), 7628 pJI5 (expressando GlnB), 7628 pJI11 (expressando GlnB V100-A), 7628 contendo o plasmídeo pJI10 (expressando GlnB L13-P), 2812 (mutante *glnB glnZ*), 2812 pJI5 (expressando GlnB), 2812 pJI11 (expressando GlnB V100-A), 2812 pJI10 (expressando GlnB L13-P), 2812 pJI1 (expressando GlnZ selvagem) e 2812 pJILZ51 (expressando GlnZ Y51-F) foi avaliada.

A TABELA 3 mostra que as estirpes FP2 e 7628 (mutante *glnB*) foram capazes de crescer utilizando nitrato como fonte única de nitrogênio, como já descrito (DE ZAMAROCZY et al., 1998), enquanto o duplo mutante *glnB glnZ* (2812) não foi capaz de crescer utilizando nitrato como única fonte de nitrogênio. Esse resultado indica que GlnB ou GlnZ é necessária para a ativação da expressão dependente da proteína NtrC do sistema assimilatório de nitrato em *A. brasilense*. O gene *glnB* selvagem e a sua forma mutante *glnB* V100-A expressos a partir do promotor *lacZ* complementaram o fenótipo de crescimento do mutante 2812, mas a forma mutante GlnB L13-P não foi capaz de reverter o fenótipo desta estirpe, sugerindo que o resíduo L13 é importante para a transdução de sinal por GlnB.

O resíduo Leu13 é altamente conservado entre as proteínas GlnB e GlnZ (GlnK) de *A. brasilense*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, GlnB e GlnK de *H. seropedicae*, GlnB, GlnJ, GlnK de *R. rubrum* e em vários outros organismos, entretanto nenhum estudo de mutagênese desse resíduo foi relatado. A mudança do aminoácido leucina, de cadeia lateral alifática, para prolina, de cadeia lateral cíclica, provavelmente restringe a conformação da cadeia polipeptídica. É provável, portanto, que esta mudança produza uma mudança substancial na estrutura da proteína.

O crescimento em nitrato do mutante 2812 não foi complementado pelo plasmídeo pJI1 que expressa o gene *glnZ* nativo. A expressão da proteína GlnZ Y51-F pelo plasmídeo pJILZ51, por outro lado, restaurou o fenótipo selvagem. Em *E. coli* a

expressão dos genes da via de utilização de nitrato requer altos níveis de NtrC-P (MILCAMPS et al., 1996). Em *A. brasilense* NtrC é necessária para crescimento em nitrato, portanto, esta característica pode servir de indicador do funcionamento do sistema Ntr como em *E. coli*. Tomados juntos, os resultados apresentados acima permitem concluir que: a) o sistema Ntr de *A. brasilense* está reprimido na ausência de uma das proteínas PII; b) a proteína GlnZ pode substituir a GlnB na regulação da proteína NtrB em *A. brasilense*; e c) a uridililação de proteína PII não é essencial para a desrepressão do sistema Ntr. Os resultados observados podem ser resultado de uma combinação de dosagem gênica e alteração de afinidade pelas proteínas receptoras de GlnZ ou GlnB.

TABELA 3 - CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE *A. brasilense* UTILIZANDO NITRATO COMO FONTE ÚNICA DE NITROGÊNIO

Crescimento dependente de nitrato						
Estirpes	Plasmídeo					
	nenhum	pJI5 (GlnB)	pJI10 (GlnB L13-P)	pJI11 (GlnB V100-A)	pJI1 (GlnZ)	pJIIZ51 (GlnZ Y51-F)
FP2	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7628	++	++	-	++	n.d.	n.d.
2812	-	++	-	++	-	+

As culturas foram inoculadas em meio NFbHP sólido contendo KNO_3 10 mmol/L por 72h a 30°C, conforme descrito em materiais e métodos (item 4.3). Símbolos: ++, crescimento bacteriano, +, crescimento deficiente; -, ausência de crescimento, n.d., não determinado. FP2, estirpe selvagem; 7628, mutante *glnB*; 2812, duplo mutante *glnB glnZ*.

4.3.6 Excreção de NH_4^+

A excreção de amônio em *A. brasilense* foi determinada nas estirpes capazes de crescer utilizando nitrato como fonte de nitrogênio: FP2 (selvagem), 7628 (mutante *glnB*), 7628 expressando GlnB-His, 7628 expressando GlnB V100-A, 2812 (mutante *glnBglnZ*) expressando GlnB-His e 2812 expressando GlnB V100-A. As culturas foram crescidas em meio NFbHP líquido contendo como fonte de nitrogênio 10 mmol/L de KNO_3 . Após 24 h de crescimento, as amostras foram coletadas, centrifugadas e a concentração de amônio no sobrenadante foi determinada pelo método do indofenol (CHANEY & MARBACH, 1962).

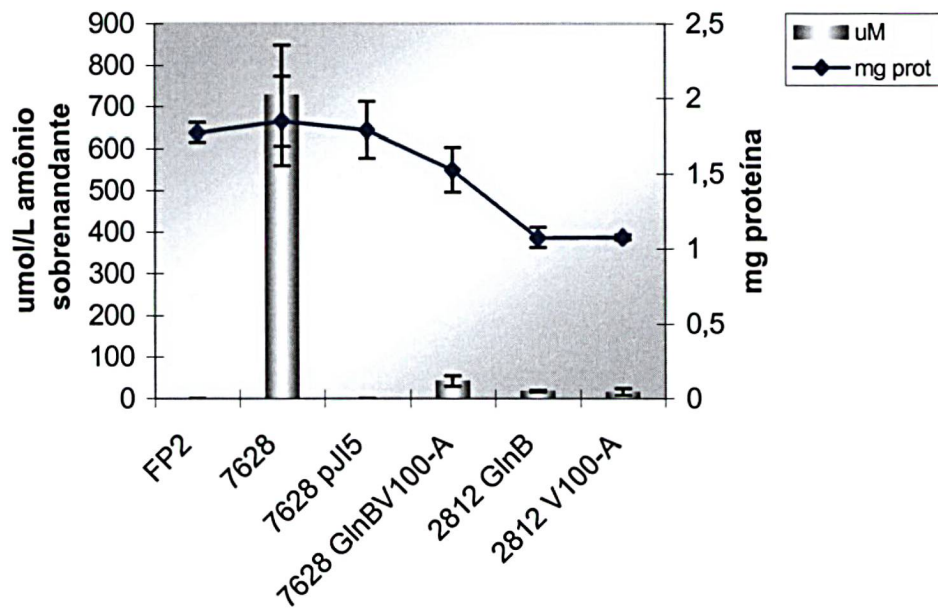
A figura 17 mostra que a estirpe 7628 excretou cerca de 700 mmol/L de NH_4^+ . Este fenótipo foi completamente complementado pelo gene *glnB* expresso pelo plasmídeo pJI5 na estirpe 7628, que não produziu quantidade detectável de amônio após 24 h de crescimento. O gene mutante *glnB* V100-A não foi capaz de reverter o fenótipo completamente. A estirpe selvagem FP2 não excretou quantidades detectáveis de amônio, mas baixos níveis de amônio foram detectados nas culturas de 2812 expressando GlnB-His e 2812 expressando GlnB V100-A. De Zamaroczy e colaboradores (1998) já haviam observado que mutantes *glnB* de *A. brasilense* são capazes de excretar amônio quando crescidos em meio contendo nitrato. Estes autores complementaram este fenótipo com o plasmídeo pAB914 que expressa o gene *glnB*. O mesmo perfil foi observado na estirpe 7628 contendo o plasmídeo pJI5 que expressa a proteína GlnB fundida à cauda de histidina, a partir do promotor *plac*.

A proteína GlnB V100-A expressa na estirpe 7628 foi incapaz de complementar totalmente o fenótipo de excreção de nitrato, indicando que o resíduo Val-100 é importante para a atividade de GlnB na sinalização para o sistema Ntr. O resíduo Val-100 é encontrado nas proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*, e nas proteínas GlnJ e GlnB de *R. rubrum*. Em *R. pneumoniae* (GlnB e GlnK) e na proteína GlnB de *R. rubrum* esse resíduo foi substituído por uma isoleucina, e em GlnZ de *A. brasilense* ocorre uma alanina (ver

alinhamento na figura 12). Essa modificação é equivalente à modificação obtida ao acaso na proteína GlnB V100-A. O resíduo Val-100 apresenta-se próximo à alça C, que está localizada próxima às alças T e B da proteína adjacente, criando uma fenda. Essa fenda aparentemente é importante para a interação de PII com as diferentes proteínas alvo (JIANG et al., 1997). A modificação de um resíduo de valina, que apresenta um radical isopropil, por uma alanina, que apresenta somente um radical metil, pode gerar uma diminuição de contato na região, provocando mudanças funcionais na proteína GlnB.

A capacidade da estirpe 7628 (*glnB* negativo) crescer utilizando nitrato mostra que GlnZ é suficiente para desreprimir o sistema Ntr e sustentar a produção de quantidades suficientes de NtrC-P. Este conclusão é corroborada pela expressão elevada e constitutiva do promotor *pglnZ*, que é dependente de NtrC-P (DE ZAMAROCZY, 1998), sugerindo que GlnB é necessária para o controle da atividade fosfatásica de NtrB e, portanto, regulação da concentração intracelular de NtrC-P. É importante notar que o duplo mutante não foi capaz de utilizar nitrato, indicando que uma das proteínas PII deve estar presente para que ocorra desrepressão do sistema Ntr. Adicionalmente, a excreção de amônio pela estirpe 7628 nas condições do ensaio, sugere que o sistema de captação de amônio está comprometido. Em *E. coli* a proteína GlnK controla o transportador de amônio AmtB, ligando-se reversivelmente na forma desuridilada. Em *Azospirillum* GlnZ parece ser a responsável por esta função. Juntos estes resultados sugerem que a expressão aumentada de GlnZ e desrepressão do sistema Ntr no mutante 7628 (*glnB*⁻) são os fatores responsáveis pela excreção de íons amônio quando a estirpe é crescida na presença de nitrato como fonte de nitrogênio. A excreção de amônio provavelmente é aumentada pelos baixos níveis de glutamina sintetase desta estirpe (DE ZAMAROCZY, 1998), diminuindo a capacidade de captura de NH₄⁺ formado pela nitrato redutase/nitrito redutase. O fenótipo é restaurado com a expressão de *glnA* a partir do plasmídeo pAB462 (DE ZAMAROCZY et al., 1998).

FIGURA 17 - EFEITO DA PROTEÍNA GlnB E SEUS MUTANTES NA EXCREÇÃO DE AMÔNIO DE ESTIRPES DE *A. brasilense*



As culturas foram crescidas em meio NFbHP lactato, contendo como fonte de nitrogênio 10mmol/L de KNO_3 . Após 24 h de crescimento amostras foram coletadas e o amônio excretado no meio ($\mu\text{mol/L}$) foi medido utilizando o método do indofenol (CHANEY & MARBACH, 1962). Os valores obtidos são médias de três experimentos independentes.

6. CONCLUSÕES

Os resíduos V100 e L13 são importantes para a atividade de nitrogenase, provavelmente sendo fundamentais para a ativação da proteína NifA em *A. brasilense*;

A uridililação de GlnZ é importante para a sinalização dos níveis de nitrogênio intracelular para as proteínas DraT/DraG;

A uridililação de GlnZ não é essencial para a ativação de DraT pela adição de íons amônio;

Os resíduos Ile-45 e Arg 101 da proteína GlnZ são importantes para a transdução de sinal e parecem estar envolvidos na sinalização de GlnZ para o sistema DraT/DraG;

GlnB ou GlnZ são necessárias para a ativação do sistema assimilatório de nitrato, dependente de NtrC. A proteína GlnB aparentemente é reguladora primária da concentração intracelular de NtrC-P, mas a proteína GlnZ pode estimular a fosforilação de NtrC no mutante *glnB* negativo de *A. brasilense*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AMAR, M., PATRIARCA, E. J., MANCO, G., BERNARD, P., RICCIO, A., LAMBERTI, A., DEFEZ, R., IACCARINO, M. Regulation of nitrogen metabolism is altered in a *glnB* mutant strain of *Rhizobium leguminosarum*. **Mol Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 685-693, Fev. 1994.
- ARAUJO, L. M., MONTEIRO, R. A., SOUZA, E. M., STEFFENS, M. B., RIGO, L. U., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Res Microbiol**. v. 155, n. 6, p. 491-495. Aug 2004.
- ARAUJO, M. S., BAURA, V. A., SOUZA, E. M., BENELLI, E. M., RIGO, L.U., STEFFENS, M. B., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S. In vitro uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Protein Expr Purif.**, v. ;33, n. 1, p. 19-24. Jan 2004.
- ARCONDÉGUY, T., HUEZ, I., TILLARD, P., GANGNEUX, C., DE BILLY, F., GOJON, A., TRUCHET, G., KAHN, D. The *Rhizobium meliloti* PII protein, which controls bacterial nitrogen metabolism, affects alfalfa nodule development. **Genes Dev**; v. 11, p. 1194–1206, Mai 1997.
- ARCONDEGUY, T., JACK, R., MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 65, n. 1, p. 80-105, Mar 2001.
- ARCONDEGUY, T., LAWSON, D., MERRICK, M. Two residues in the T-loop of GlnK determine NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression. **J Biol Chem**. v. 8, n. 275(49), p. 38452-38456, Dez 2000.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol**, v. 178, p.4830-4838, Aug1996.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P(II): effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol. I ett**. v. 179, p. 339-343, Out1999.
- ATKINSON, M. R., NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**. v.32, n. 2, p. 301-313, Abr 1999.

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

BASHAN, Y., SINGH, M., LEVANONY, H. Contribution of *A. brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Can. J. Bot.** 67, 2429-2434, 1989.

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

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.** v. 47, p. 309-314, Abr 2001.

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

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant Soil** v. 95, n. 1, p. 109-121, 1986.

BONATTO, A. C., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., YATES, M. G., BENELLI, E. M. Effect of T- and C-loop mutations on the *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein in nitrogen signalling. **Res Microbiol.**, v. 156, n. 5-6, p. 634-640, Jun-Jul 2005.

BORGHESE, R., WALL, J. D. Regulation of the *glnBA* operon of *Rhodobacter capsulatus*. **J Bacteriol**, v. 177, p. 4549-4552, Ago 1995.

BOZOUKLIAN, H., ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. **Biochimie.**, v. 68, n. (10-11), p 1181-1187, Out 1986.

BOZOUKLIAN, H., FOGHER, C., ELMERICH, C. Cloning and characterization of the *glnA* gene of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Ann Inst Pasteur Microbiol.** v. 137 B, n. 1, p. 3-18, Jul 1986.

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

- BUCK, M., GALLEGOS, M. T., STUDHOLME, D. J., GUO, Y., GRALLA, J. D. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. **J Bacteriol**, v. 182, n. 15, p. 4129-4136, Aug 2000.
- BUENO, R., PAHEL, G., MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 164, p. 816-822, Nov 1985.
- BURRIS, R. H. Nitrogenases. **J Biol Chem**. v. 25, n. 266 (15), p. 9339-9342, Mai 1991.
- CARR, P. D. X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.**, v. 52, p. 93-104, Jan 1996.
- CHANEY, A. L., MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clin Chem**. p.130-132, Abr 1962.
- COLNAGHI, R., RUDNICK, P., HE, L., GREEN, A., YAN, D., LARSON, E., KENNEDY, C. Lethality of *glnD* null mutations in *Azotobacter vinelandii* is suppressible by prevention of glutamine synthetase adenylation. **Microbiology**, v. 147, p.1267-1276, Mai 2001.
- COLONNA-ROMANO, S., PATRIARCA, E. J., AMAR, M., BERNARD, P., MANCO, G., LAMBERTI, A., IACCARINO, M., DEFEZ, R. Uridylation of the PII protein in *Rhizobium leguminosarum*. **FEBS Lett**, v. 330, p. 95-98, Set 1993.
- CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M.; BALI, A.; BLANCO, G.; GARCIA, E.; BUSH, G.; KENEDY, C.; MERRICK, M. The product of nitrogen fixation regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 7741-7749, Dez 1991.
- COUTTS, G., THOMAS, G., BLAKEY, D., MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J**. v. 15, n. 21(4), p. 536-545, Fev 2002.
- DE MEL, V. S. J., KAMBEROV, E. S. ; MARTIN, P. D.; ZHANG, J., NINFA, A. J., EDWARDS, B. F. P. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, v.243, p. 796-798, 1994.
- DE ZAMAROCZY, M., DELORME, F., ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Mol Gen Genet**. v. 224, n. 3, p.421-430, Dez 1990.

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

DE ZAMAROCZY, M., PAQUELIN, A., PELTRE, G., FORCHHAMMER, K., ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol.** v. 178, n. 14, p. 4143-4149, Jul 1996.

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochim Biophys Acta.** v.31, n. 127(2), p. 285-294, Out 1966.

DIXON, R., KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat Rev Microbiol.** v.2, n. 8, p. 621-631, Ago 2004.

DREPPER, T., GROSS, S., YAKUNIN, A. F., HALLENBECK, P. C., MASEPOHL, B., KLIPP, W. Role of *GlnB* and *GlnK* in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology.** v. 149, p. 2203-2213, Ago 2003.

DURNER, J., BOHM, I., HILZ, H., BOGER, P. Posttranslational modification of nitrogenase. Differences between the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* and the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Eur J Biochem.**, v. 15, n. 220 (1), p.125-130, Fev. 1994 .

EADY, R. R. Enzimology in free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J.; PUHLER, S. (Ed) **Nitrogen Fixation**, v. 4 p. 1-49, 1986.

EADY, R. R. Structure minus sign Function Relationships of Alternative Nitrogenases. **Chem Rev.**, v. 7; n. 96 (7), p. 3013-3030, Nov 1996.

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

EMBRAPA. Disponível em:

http://www.cnpq.br/areas/agropecuaria_biotechnologia/biotechnologia/genoma/lab_embraapa_parana.htm. Acesso em: 15 Dez 2004 a.

EMBRAPA. Disponível em:

http://www21.sede.embrapa.br/a_embraapa/unidades_centrais/acs/publicacoes/institucional/balancoambiental.pdf. Acesso em: 24 dez 2004 b.

FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *A. brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 281 – 288, Out 1999.

FAGES, J.. *Azospirillum* inoculants and field experiments,. In Y. Okon (ed.), ***Azospirillum/plant associations***. CRC Press, Boca Raton, Flórida p. 87-109. 1994.

FAIRBANKS, M. Disponível em:

<http://www.quimica.com.br/revista/qd424/fertilizantes1.htm> .**Química e Derivados**, n. 424. Março de 2004. Acesso em: 15 dez. 2004.

FALKOWSKI, P.O.G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. **Nature**, v. 387, p. 272 – 275, 1997.

FANI, R., ALLOTTA, G., BAZZICALUPO, M., RICCI, F., SCHIPANI, C., POLSINELLI, M. Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein (*nifH*) of *Azospirillum brasilense* and identification of a region controlling *nifH* transcription. **Mol Gen Genet.** v. 220, n. 1, p. 81-87, Dez 1989.

FOOR, F., JANSSEN, K., MAGASANIK, B. Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.72, p. 4844-4848, Dez 1978.

FORCHHAMMER, K., TANDEAU, DE MARSAC. N.Functional analysis of the phosphoprotein PII (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942. **J Bacteriol.**, v. 177, n. 8, p.2033-2040, Abr. 1995.

FU, H., BURRIS, R. H., ROBERTS, G. P.. Reversible ADP-ribosylation is demonstrated to be a regulatory mechanism in prokaryotes by heterologous expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 87, p. 1720-1724, Mar 1990.

FU, H.A., HARTMANN, A., LOWERY, R. G., FITZMAURICE, W. P., ROBERTS, G.P., BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **J Bacteriol.** v. 171, n. 9, p. 4679-4685, Set 1989.

GRUNWALD, S. K., LUDDEN, P.W. NAD-dependent cross-linking of dinitrogenase reductase and dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from *Rhodospirillum rubrum*. **J Bacteriol.**, v.179, n.10, p.3277-3283, Mai 1997.

GRUNWALD, S. K., ZHANG, Y., HALBLEIB, C., ROBERTS, G. P., LUDDEN, P. W. A proposed role for protein. Protein complexes in the regulation of the reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase. **Adv Exp Med Biol.** v. 419, p. 61-69, 1997.

GRUNWALD, S. K.; LIES, D. P.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum* strains overexpressing the regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase activating glycohydrolase. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 628-635, Feb 1995.

HAAKER, H., LAANE, C., HELLINGWERF, K., HOUWER, B., KONINGS, W.N., VEEGER, C. Short-term regulation of the nitrogenase activity in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. **Eur J Biochem.** v.127, n. 3, p.639-645, Out 1982.

HABER PROCESS RESEARCH SITE. Disponível em:
<http://haberchemistry.tripod.com/#Fertilizers>. Acesso em: 20 dez. 2004.

HAGEMAN, R. V., BURRIS, R. H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Proc Natl Acad Sci USA** . v. 75, n. 6, p. 2699-2702, Jun 1978.

HALBLEIB, C. M., LUDDEN, P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. **J. Nutr Review.** v. 130, n.5, p.1081-1084, Mai. 2000.

HALBLEID, C. M.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Effects of Perturbations of the Nitrogenase Electron Transfer Chain on Reversible ADP-Ribosylation of Nitrogenase Fe Protein in *Klebsiella pneumoniae* Strains Bearing the *Rhodospirillum rubrum dra* Operon. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 3681-3687, Jul 2000a.

HARTMANN, A., BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **J Bacteriol.**, v. 169, n. 3, p. 944-948, Mar 1987.

HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **J. Bacteriol.** v. 165, n. 3, p. 864-870, Mar 1986.

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

HO, Y. S., BURDEN, L. M., HURLEY, J. H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J.** v. 16; n. 19(20), p. 5288-5299, Oct 2000.

HOLGUIN, G., PATTEN, C. L., GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. **Biology and fertility of soils.** v. 29, n. 1, p. 10-23, Aug 1999.

HSIEH, M. H., LAM, H. M., VAN DE LOO, F. J., CORUZZI, G. A. PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 10, n. 95 (23), p. 13965-13970, Nov 1998.

HUERGO, L. F., SOUZA, E. M., STEFFENS, M. B., YATES, M. G., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 6, n. 223 (1), p. 33-40, Jun. 2003.

HUERGO, L. F., SOUZA, E. M., STEFFENS, M. B., YATES, M. G., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L. S. Effects of over-expression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium-dependent post-translational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*. **Arch Microbiol.**, v. 183, n. 3, p. 209-217, Mar 2005

IBGE. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=304&id_pagina=1. Acesso em: 15 dez 2005.

JACK, R., DE ZAMAROCZY, M., MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol**, Washington, v. 181, n. 4, p.1156-1162, Fev. 1999.

JAGGI, R., YBARLUCEA, W., CHEAH, E., CARR, P. D., EDWARDS, K. J, OLLIS, D., VASUDEVAN, S. G. The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*. **FEBS Lett** v. 391, p. 223–228, Ago 1996.

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

JAVELLE, A., SEVERI, E., THORNTON, J., MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J Biol Chem.** v. 5, n. 279 (10), p. 8530-8538, Mar 2004.

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

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

- JIANG, P., PELISKA, J. A., NINFA, A. J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, v. 37, p. 12782–12794. Set 1998c
- JIANG, P., ZUCKER, P., NINFA, A.J. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits. **J Bacteriol**, v. 179, p.4354–4360, Jul 1997.
- JIANG, P., NINFA, A. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol**, v. 181, p. 1906-1911, Mar 1999.
- JOHANNSSON, M., NORDLUND, S. Uridylylation of the PII protein of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J Bacteriol**, v. 179, p. 4190–4194, Jul 1997.
- JOHANNSSON, M., NORDLUND, S. Transcription of the *glnB* and *glnA* genes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 142, p. 1265–1272, Ago 1996.
- JONES, B. L., MONTY, K. J. Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodopseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. **J Bacteriol.**, v. 139, n. 3, p. 1007-1013, Set 1979.
- KAMBEROV, E. S, ATKINSON, M. R., CHANDRAN, P., NINFA, A. J. Effect of mutations in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. **J Biol Chem** v. 11, n. 269 (45), p. 28294-28299, Nov 1994.
- KAMBEROV, E. S., ATKINSON, M. R., NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J Biol Chem**, v. 270, p. 17797 – 17807, Jul 1995.
- KANEMOTO, R.H., LUDDEN, P.W. Effect of ammonia, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification in *Rhodospirillum rubrum*. **J Bacteriol**, v. 158, n. 2, p.713-720, Mai. 1984.
- KEENER, J., KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria: roles of the conserved

amino-terminal domain of NtrC. **Proc Natl Acad Sci USA**; v. 85, p. 4976–4980, Jul 1988.

KERN, D., VOLKMAN, B. F., LUGINBUHL, P., NOHAILE, M. J., KUSTU, S., WEMMER, D. E. Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. **Nature**, v. 402, p. 894–898, Dez 1999.

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

KLEINER, D., ALEF, K., HARTMANN, A. Uptake of methionine sulfoximine by some N₂ fixing bacteria, and its effect on ammonium transport. **FEBS Lett**, v. 28, n. 164 (1), p. 121-213. Nov 1983.

KLUGKIST, J., HAAKER, H. Inhibition of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol**, v. 157, n. 1, p. 148-151, Jan 1984.

LAANE, C., KRONE, W., KONINGS, W., HAAKER, H., VEEGER, C. Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* and by bacteroides of *Rhizobium leguminosarum*. **Eur J of Bioch.** v. 103, n. 1, p. 39–46, 1980.

LIANG, Y. Y., ARSENE, F., ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Mol Gen Genet**, v. 240, p.188 –196, Ago 1993.

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

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

LIN, C.F. Investigation of criteria for soil fertility capability classification of Taiwan soils. **Reports on Soil and Fertilizer Experiments**, Department of Agriculture and Forestry, Taiwan Provincial Government, 1983.

LIN-GOERKE, J. L., ROBBINS, D. J., BURCZAK, J. D. PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 409-412, Set.1997.

LITTLE, R., DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **J Biol Chem.** v. 1, n. 278 (31), p. 28711-28718, Ago 2003.

LITTLE, R., REYES-RAMIREZ, F., ZHANG, Y., VAN HEESWIJK, W., DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. **EMBO J**, v. 19, p. 6041-6059. Nov 2000.

LOWERY, R. G., SAARI, L. L., LUDDEN, P. W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation *in vitro*. **J. Bacteriol**, v. 166, n.2, p. 513-518. Mai 1986.

LUDDEN, P. W., LEHMAN, L., ROBERTS, G. P. Reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in a *nifD*- mutant of *Rhodospirillum rubrum*. **J Bacteriol.**;v. 171, n. 9, p. 5210-5211, Set 1989.

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

MACHADO, I. M. P., YATES, M. G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, p. 1599-1602, Dez 1996.

MAGASANIK, B. Global regulation of gene expression. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 19, n. 97(26), p. 14044-14045, Dec 2000.

MARINE, A.-M., ANDRÉ, B. *In vivo* N-glycosylation of the Mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. **Mol Microbiol**, v. 38, p. 552-564, Nov 2000.

MARTIN, D.E., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. Occurrence of three PII-like signal transmitter proteins in the diazotrophic proteobacterium *Azoarcus sp.* BH72. **Mol Microbiol**, v. 38, p. :276–288, Out 2000.

MARTIN, G. B., THOMASHOW, M. F., CHELM, B. K. *Bradyrhizobium japonicum* *glnB*, a putative nitrogen-regulatory gene is regulated by NtrC at tandem promoters. **J Bacteriol**; v. 171, p.5638–5645, Out 1989.

MASEPOHL, B., KREY, R., KLIPP, W. The *draTG* gene region of *Rhodobacter capsulatus* is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase. **J Gen Microbiol**, v. 139, n. 11, p. 2667-2675, Nov. 1993.

MELETZUS, D., RUDNICK, P., DOETSCH N., GREEN, A., KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-amtB* operon of *Azotobacter vinelandii*. **J Bacteriol**, v. 180, n.12, p. 3260-3264, Jun. 1998.

MERRICK, M. J., CHAMBERS, S. The helix-turn-helix motif of σ^{54} is involved in recognition of the -13 promoter region. **J Bacteriol**. v. 174, p. 7221-7226, Nov 1992.

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

METTKE, I., FIEDLER, U., WEISS, V. Mechanism of activation of a response regulator: interaction of NtrC-P dimers induces ATPase activity. **J Bacteriol**; v. 177,;p. 5056-5061, Set 1995.

MICHEL-REYDELLET, N., DESNOUES, N., de ZAMAROCZY, M., ELMERICH, C., KAMINSKI, P. A. Characterisation of the *glnK-amtB* operon and involvement of AmtB in methylammonium uptake in *Azorhizobium caulinodans*. **Mol Gen Genet**, v. 258, p. 671-677, Jun 1998.

MICHEL-REYDELLET, N., DESNOUES, N., ELMERICH, C., KAMINSKI, P.A. Characterization of *Azorhizobium caulinodans glnB* and *glnA* genes: involvement of the PII protein in symbiotic nitrogen fixation. **J Bacteriol**, v. 179, p. 3580-3587, Jun 1997.

MILCAMP, A., VAN DOMMELEN, A., STIGTER, J., VANDERLEYDEN, J., DE BRUIJN, F. J. The *Azospirillum brasilense rpoN* gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. **Can J Microbiol.**, v. 42, n. 5, p.:467-478, Mai 1996.

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

MILLER, J.H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 456p., 1992.

MONTEIRO, R. A., SOUZA, E. M., FUNAYAMA, S., YATES, M. G., PEDROSA, F. O., CHUBATSU, L.S. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.**, v. 26, n. 447(2-3), p. 283-286 Mar 1999.

- NINFA, A. J., UENO-NISHIO, S., HUNT, T. P., ROBUSTELL, B., MAGASANIK, B. Purification of nitrogen regulator II, the product of the *glnL* (*ntrB*) gene of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**; v. 168, p. 1002–1004, Ago 1986.
- NINFA, A. J. Regulation of gene transcription by extracellular stimuli. In: Neidhardt FC, et al., editors. ***Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology***. Washington, D.C.: ASM Press; p. 1246–1262, 1996.
- NINFA, A. J., BENNETT, R. L. Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NRII. **J Biol Chem**, v. 266, p. 6888–6893, Abr 1991.
- NINFA, A. J., MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 83, n.16, p. 5909-13, Ago 1986.
- NINFA, E. G., ATKINSON, M. R., KAMBEROV, E. S., NINFA, A. J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. **J Bacteriol**, v. 175, p. 7024–7032, Nov 1993.
- O' CONNELL, K. P., RAFFEL, S. J., SAVILLE, B. J., HANDELSMAN, J. Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants. **Microbiology**, v. 144, p. 2607–2617, Set 1998.
- OKON, Y., ALBRECHT, S. L., BURRIS, R. H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. **J Bacteriol.**, v. 127, n. 3, p. 1248-1254, Set 1976.
- OKON, Y., LABANDERA-GONZÁLEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol. Biochem.** v. 26, p. 1591-1601, 1994
- PARKINSON, J. S.; KOFOID, E. C.; Communication modules in bacterial signalling proteins. **Annu. Rev. Gen.**, v. 26, p. 71-112, 1992.
- PEDROSA, F., YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiol Lett**, v. 23, p. 95-101, 1984.
- PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio fértil idéia. **Ciência hoje**, v.6, p.12-13, 1987.
- PERLOVA, O., NAWROTH, R., ZELLERMANN, E. M., MELETZUS, D. Isolation and characterization of the *glnD* gene of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, encoding a

putative uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme. **Gene**. v. 4; n. 297(1-2), p. 159-168, Set 2002.

PERLOVA, O., URETA, A., NORDLUND, S., MELETZUS, D. Identification of three genes encoding P(II)-like proteins in *Gluconacetobacter diazotrophicus*: studies of their role(s) in the control of nitrogen fixation. **J Bacteriol.**, v. 185, n. 19, p.5854-5861, Out 2003.

PIERRARD, J., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*: existence of two independent regulatory effects of ammonium. **J Bacteriol.**, v. 175, n. 5, p.1358-1366, Mar 1993.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 252p.

QIAN, Y., TABITA, F. R. Expression of *glnB* and a *glnB*-like gene (*glnK*) in a ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. **J Bacteriol.**, v. 180, p. 4644–4649, Set 1998.

RAMOS, H. J., RONCATO-MACCARI, L. D., SOUZA, E. M., SOARES-RAMOS, J. R., HUNGRIA, M., PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **J Biotechnol.** v. 28; n. 97(3), p.243-252. Aug, 2002.

RUDNICK, P., KUNZ, C., GUNATILAKA, M. K., HINES, E. R., KENNEDY, C. Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. **J Bacteriol.**, v.184, n. 3, p. 812-820, Fev. 2002.

RUDNICK, P.; COLNAGHI, R.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Molecular analysis of the *glnB*, *amtB*, *glnD* and *glnA* genes in *Azotobacter vinelandii*. In: Elmerich C, Kondorosi A, Newton WE, editors. **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, p. 123–124, 1998.

RUDNICK, P. A., ARCONDEGUY, T., KENNEDY, C. K., KAHN, D. *glnD* and *mviN* are genes of an essential operon in *Sinorhizobium meliloti*. **J Bacteriol.**, v. 183, n. 8, p. 2682-2685, Abr 2001.

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

SCHLUTER, A., NOHLEN, M., KRAMER, M., DEFEZ, R., PRIEFER, U. B. The *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae *glnD* gene, encoding a uridylyltransferase/uridylyl-

removing enzyme, is expressed in the root nodule but is not essential for nitrogen fixation. **Microbiology**, v. 146, p. 2987-2996, Nov 2000.

SCHOLLHORN, R., BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 58, n. 1, p. 213-216, Jul 1967.

SCHRANK, I. S., ZAHA, A., DE ARAUJO, E. F., SANTOS, D.S. Construction of a gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a recombinant containing the *nif* structural genes. **Braz J Med Biol Res**.v. 20, p.321-330,1987.

SHAPIRO, B. M., STADTMAN, E., R. Glutamine synthetase deadenylylating enzyme. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 30, p. 32-37, Jan 1968.

SHREVE, R. N., BRINK Jr., A. *Indústria de processos químicos*, Editora Guanabara Dois, RJ, 1980.

STEENHOUDT, O., VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev.**;v. 24, n. 4, p. 487-506, Out 2000.

STOCK, J. B., NINFA, A. J., STOCK, A. M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. **Microbiol Rev**, n. 53, p. 450-490, Dez 1989.

TARRAND, J. J., KRIEG, N. R., DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can J Microbiol**, v. 24, n. 8, p.967-80, Aug 1978.

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

THOMAS, G., MULLINS, J. G. L.,MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Mol Microbiol**, v. 137, p. 331-344, Jul 2000b.

THOMELY, R. N. F.,LOWE, D. J. **Molybdenum Enzymes** (ed. Spiro, T. G.) 221-284. John Wiley, Nova York, 1985.

THORNELEY, R. N., LOWE, D. J. The mechanism of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase action. Pre-steady-state kinetics of an enzyme-bound intermediate in N₂ reduction and of NH₃ formation. **Biochem J**. v. 15, n. 224 (3), p. 887-894, Dez 1984.

VAN DOMMELEN, A., KEIJERS, V., SOMERS, E., VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Mol Genet Genomics** v. 266, n. 5, p. 813-820, Jan 2002.

VAN DOMMELEN, A., KEIJERS, V., VANDERLEYDEN, J., DE ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol.** v.180, n. 10, p. 2652-2659, Mai 1998.

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

VAN HEESWIJK, W.C., STEGEMAN, B., HOVING, S., MOLENAAR, D., KAHN, D., WESTERHOFF, H.V. An additional PII in *Escherichia coli*: a new regulatory protein in the glutamine synthetase cascade. **FEMS Microbiol Lett.** v. 1, n. 132 (1-2), p. 153-157, Out 1995.

VANDE BROEK, A., DOBBELAERE, S., VANDERLEYDEN, J., VANDOMELLEN, A., *Azospirillum*-plant root interactions: signaling and metabolic interactions. In: Prokariotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process. Horizon Scientific Press, p. 761-777, 2000.

VOLKMAN, B.F., NOHAILE, M. J., AMY, N. K., KUSTU, S., WEMMER, D.E. 3-Dimensional solution structure of the N-terminal receiver domain of NtrC. **Biochemistry**, v. 34, p. 1413–1424, Jan 1995.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil.** v.210, n. 1,p.103-113, Mar 1999.

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

WEISS, V.; CLAVERIE-MARTIN, F.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen-regulator I (NRI) of *Escherichia coli* induces the strong cooperative binding to DNA essential for the activation of transcription. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 5088-5092, Set 1992.

- WESTBY, C. A., ENDERLIN, C. S., STEINBERG, N. A., JOSEPH, C. M., MEEKS, J. C. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **J Bacteriol**, v.169, n. 9, p. 4211-4214, Set 1987.
- WRAY, L.V. J. R., ATKINSON, M. R., FISHER, S. H. The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis nrgAB* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli glnB*-encoded PII protein. **J Bacteriol**. v.176, n. 1, 108-114, Jan 1994.
- WYMAN, C., ROMBEL, I., NORTH, A. K., BUSTAMANTE, C., KUSTU, S. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. **Science**. v. 14, n.275 (5306), p.1658-1661, Mar. 1997.
- XU, Y., CHEAH, E., CARR, P. D., VAN HEESWIJK, W. C., WESTERHOFF, H.V., VASUDEVAN, S. G., OLLIS, D.L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J Mol Biol**, v. 11, n. 282(1), p. 149-165, Set 1998.
- YAMASHITA, M. M., ALMASSY, R. J., JANSON, C.A., CASCIO, D., EISENBERG, D. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5Å resolution. **J Biol Chem**, v. 264, p. 17681-17690, Out 1989.
- YAN, D., HE, L., LI, J. Cloning and sequencing of *ntrBC* genes from *Azospirillum brasilense* **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 35, n.4, p. 242-249, Aug 1995.
- YOCH, D. C., LI, J. D., HU, C. Z., SCHOLIN, C. Ammonia switch-off of nitrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* and *Methylosinus trichosporium*: no evidence for Fe protein modification. **Arch Microbiol**, v. 150, n. 1, p.1-5, Mai 1988.
- ZHANG, Y., BURRIS, R. H., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense ntrBC* mutants: ammonium and anaerobic switch-off occurs through independent signal transduction pathways. **J Bacteriol**, v. 176, n. 18, p. 5780-5787, Set 1994.
- ZHANG, Y., BURRIS, R. H., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. **J Bacteriol**, v. 178, n. 10, p. 2948-2953, Mai 1996.
- ZHANG, Y., BURRIS, R. H., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol Lett**. v. 15, n. 152 (2), p.195-204, Jul 1997.

ZHANG, Y., POHLMANN, E. L., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J Bacteriol**, v. 182, n. 4, p. 983-992, Fev 2000.

ZHANG, Y., POHLMANN, E. L., LUDDEN, P. W., ROBERTS, G. P. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. **J Bacteriol.**, v. 183, n. 21, p. 6159-68, Nov 2001.

ZHANG, Y., POHLMANN, E. L., ROBERTS, G.P. Identification of critical residues in GlnB for its activation of NifA activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 2, n. 101 (9), p.2782-2787, Mar 2004.

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

ZINCHENKO, V., CHURIN, Y., SHESTOPALOV, V., SHESTAKOV, S. Nucleotide sequence and characterisation of *Rhodobacter sphaeroides glnB* and *glnA* genes. **Microbiology**, v. 140, p. 2143–2151, Ago 1994.

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