

GUSTAVO HENRIQUE COUTO

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE  
*Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira  
Pedrosa

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Machado  
Benelli


CURITIBA  
2005

## TERMO DE APROVAÇÃO

GUSTAVO HENRIQUE COUTO

### EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:   
Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

  
Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Roseli Wassem

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rose Adele Monteiro

Curitiba, 16 de março de 2005

**ORIENTADORES:**

**Fábio de Oliveira Pedrosa**

**Elaine Machado Benelli**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Grupo de Fixação de Nitrogênio, pela sua orientação, ensinamentos e apoio durante todo esse período;

à Prof.<sup>a</sup> Elaine Machado Benelli pela sua orientação e incentivo;

aos professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio: Prof. Emanuel Maltempi de Souza, Prof.<sup>a</sup> Leda S. Chubatsu, Prof.<sup>a</sup> Roseli Wassem, Prof.<sup>a</sup> Maria Berenice Steffens, Prof. Leonardo Magalhães Cruz, Prof.<sup>a</sup> Rose Adele Monteiro e Prof.<sup>a</sup> Liu Un Rigo pelos ensinamentos e sugestões;

à Rose Prado, Valter e Dona Julieta pela ajuda constante, disponibilidade e agradável companhia;

aos colegas e amigos da sala 275: Juliana Inaba, Ana C., Marcelo Assumpção, Geraldo Pichetti, Cíntia Pichetti, Adriana Twerdchilib e Magda pelo convívio diário, ajuda, amizade e por me agüentarem durante todo esse tempo;

aos colegas e amigos dos outros laboratórios: Rafael, Carol, Michele H., André, Humberto, Luciano, Lílian, Luíza, Fabi, Marcelo M., Adriana I., Cláudio, Patylene, Stefan, Helisson, Lys, Marcos, Dani, Giovana, Karen, Salah, Michele T., pelo convívio, ajuda e amizade;

aos colegas da turma de mestrado 2003, Marcelo, Diogo, Tati, Giovana, Graciele, Gerusa, Lauro, Ju, Patylene e Ana pela amizade que construímos durante todo esse tempo,

o apoio a Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica: Prof.<sup>a</sup> Fanny Reicher, Prof.<sup>a</sup> Leda S. Chubatsu, Prof.<sup>a</sup> Maria Eugênia e a Dona Marilza;

à CAPES pelo suporte financeiro;

à minha família, em especial aos meus pais: Lutero e Marília, pelo incentivo incondicional em todos os momentos deste percurso.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS.....  | ix  |
| LISTA DE TABELAS.....  | xi  |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | xii |
| RESUMO.....  | xiv |
| <br>   |     |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 1   |
| 1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....   | 1   |
| 1.1.1 Importância Econômica e Ambiental.....   | 2   |
| 1.1.2 Bactérias Diazotróficas de Plantas Não-leguminosas.....  | 2   |
| 1.2 O GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> .....   | 3   |
| 1.2.1 Histórico.....   | 3   |
| 1.2.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....  | 4   |
| 1.2.3 Distribuição Ecológica e Associações Simbióticas das Espécies<br>do Gênero <i>Herbaspirillum</i> ..... | 5   |
| 1.2.4 Outros Benefícios Relacionados ao <i>H. seropedicae</i> .....  | 7   |
| 1.3 COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE.....  | 7   |
| 1.4 OS GENES <i>nif</i> .....  | 9   |
| 1.5 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM BACTÉRIAS.....  | 10  |
| 1.5.1 Glutamina Sintetase.....   | 12  |
| 1.6 O SISTEMA Ntr: SISTEMA DE REGULAÇÃO DE NITROGÊNIO.....   | 13  |
| 1.6.1 Cascatas Regulatórias.....   | 13  |
| 1.6.2 Cascata Regulatória do Sistema Ntr.....  | 13  |
| 1.6.2.1 Organização e Composição.....  | 13  |
| 1.6.2.2 Funcionamento da Cascata Ntr em Enterobactérias.....   | 15  |
| 1.7 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM <i>H. seropedicae</i> .....  | 17  |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.8 A PROTEÍNA GlnD.....   | 19        |
| 1.8.1 Histórico.....   | 19        |
| 1.8.2 Relação da Proteína GlnD com a GS e o Sistema Ntr.....         | 20        |
| 1.8.3 Mecanismo Cinético da proteína GlnD.....                       | 22        |
| 1.8.4 Domínios Conservados da Proteína GlnD.....                     | 24        |
| 1.8.4.1 Domínio Nucleotidiltransferase.....                          | 24        |
| 1.8.4.2 Domínio HD.....  | 25        |
| 1.8.4.3 Domínio ACT.....   | 25        |
| 1.8.5 Outras Funções Relacionadas à Proteína GlnD.....               | 26        |
| 1.9 A PROTEÍNA GlnB.....   | 27        |
| 1.9.1 Efeito de Moléculas Efetoras na Proteína GlnB.....             | 28        |
| 1.9.2 Proteína GlnB de <i>H. seropedicae</i> .....                   | 28        |
| 1.9.2.1 Uridililação da Proteína GlnB de <i>H. seropedicae</i> ..... | 29        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                   | <b>31</b> |
| 3.1 ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS.....                           | 31        |
| 3.2 MEIOS DE CULTIVO.....  | 32        |
| 3.3 ANTIBIÓTICOS.....  | 33        |
| 3.4 MANUTENÇÃO DOS MICROORGANISMOS.....                              | 34        |
| 3.5 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....                               | 34        |
| 3.6 MANIPULAÇÃO DE DNA.....  | 34        |
| 3.6.1 Purificação de DNA Cromossomal de <i>H. seropedicae</i> .....  | 34        |
| 3.6.2 Purificação de DNA Plasmidial.....                             | 35        |
| 3.6.3 Digestão do DNA com Enzimas de Restrição.....                  | 36        |
| 3.6.4 Preparo dos Vetores de Expressão.....                          | 36        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.6.5     | Clonagem do Gene <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> nos Vetores de Expressão.....  | 36        |
| 3.6.6     | Análise dos Plasmídeos Recombinantes.....  | 37        |
| 3.7       | AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>GlnD</i> de <i>H. seropedicae</i> .....  | 38        |
| 3.8       | SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i> .....  | 39        |
| 3.9       | TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO.....  | 39        |
| 3.9.1     | Preparo de Bactérias <i>E. coli</i> Eletrocompetentes.....   | 39        |
| 3.9.2     | Transformação Bacteriana.....  | 40        |
| 3.10      | ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA.....   | 40        |
| 3.11      | SUPEREXPRESSION DAS PROTEÍNAS <i>GlnD</i> E <i>GlnD-HIS</i><br>DE <i>H. seropedicae</i> .....  | 40        |
| 3.11.1    | Verificação dos Diferentes Parâmetros que Influenciam o Nível de<br>Expressão e o Grau de Solubilidade das Proteínas <i>GlnD</i> e <i>GlnD-His</i><br>de <i>H. seropedicae</i> ..... | 40        |
| 3.11.2    | Superexpressão da Proteína <i>GlnD</i> e <i>GlnD-His</i> de <i>H. seropedicae</i> para<br>Purificação.....   | 41        |
| 3.12      | PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GlnD-His</i> DE <i>H. seropedicae</i> POR<br>CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....  | 42        |
| 3.13      | PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA <i>GlnD</i> NATIVA DE <i>H. seropedicae</i><br>POR TROÇA IÔNICA.....   | 43        |
| 3.14      | ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES<br>DESNATURANTES (SDS-PAGE).....   | 45        |
| 3.15      | QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....  | 45        |
| 3.16      | ANÁLISE DA HOMOGENEIDADE DA PROTEÍNA <i>GlnD</i> .....   | 45        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>46</b> |
| 4.1       | ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS DA<br>PROTEÍNA <i>GlnD</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....  | 46        |
| 4.2       | AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE <i>glnD</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....   | 56        |
| 4.3       | EXPRESSION DAS PROTEÍNAS <i>GlnD</i> E <i>GlnD-HIS</i> DE<br><i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> .....   | 57        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O NÍVEL DE EXPRESSÃO E O GRAU DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i> SUPEREXPRESSA EM <i>E. coli</i> RB9065( $\lambda$ DE3)..... | 62        |
| 4.5 OTIMIZAÇÃO DO TAMPÃO DE LISE.....   | 68        |
| 4.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD-His DE <i>H. seropedicae</i> POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....   | 72        |
| 4.7 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE <i>H. seropedicae</i> POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....   | 75        |
| <b>4. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>78</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>79</b> |



## LISTA DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| FIGURA 1  | ESQUEMA DEMONSTRANDO A VIA DE ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO (GS E GOGAT) EM <i>E. coli</i> E A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE GS VIA RETRO-ALIMENTAÇÃO CUMULATIVA..... | 11 |
| FIGURA 2  | CASCATA REGULATÓRIA DO SISTEMA Ntr EM <i>Escherichia coli</i> .....  | 16 |
| FIGURA 3  | ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E REGULAÇÃO DOS GENES <i>Nif</i> EM <i>H. seropedicae</i> .....   | 18 |
| FIGURA 4  | ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO CINÉTICO DAS REAÇÕES DE ADIÇÃO E REMOÇÃO DE UMP DA PROTEÍNA PII CATALIZADO PELA PROTEÍNA GlnD.....                   | 23 |
| FIGURA 5  | ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA GlnD.....  | 26 |
| FIGURA 6  | MAPA FÍSICO DA REGIÃO DO GENOMA DO <i>H. seropedicae</i> QUE CONTÊM O GENE <i>glnD</i> .....   | 47 |
| FIGURA 7  | SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS DOS GENES <i>map</i> E <i>glnD</i> COM SUAS PROVÁVEIS REGIÕES REGULADORAS DE TRANSCRIÇÃO.....                 | 48 |
| FIGURA 8  | LOCALIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS CONSERVADOS NA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i> .....   | 53 |
| FIGURA 9  | COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i> COM A PROTEÍNA GlnD DE OUTROS ORGANISMOS.....                           | 54 |
| FIGURA 10 | PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>glnD</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....  | 56 |
| FIGURA 11 | ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i> .....   | 58 |
| FIGURA 12 | ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE <i>E. coli</i> BL21( $\lambda$ DE3) <i>pLysS</i> EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS   |    |

|  |    |
|--|----|
| GlnD-HIS e GlnD NATIVA DE <i>H. seropedicae</i> .....  | 59 |
| FIGURA 13 COMPARAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DE GlnD-HIS E GlnD NAS CÉLULAS BL21( $\lambda$ DE3) <i>pLysS</i> e RB9065( $\lambda$ DE3).....                                      | 60 |
| FIGURA 14 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> RB9065( $\lambda$ DE3).....                                | 61 |
| FIGURA 15 DISTRIBUIÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS DAS PROTEÍNAS GlnD-HIS E GlnD DE <i>H. seropedicae</i> NO TAMPÃO A200.....  | 63 |
| FIGURA 16 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE <i>N</i> -LAURIL-SARCOSIL NA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE <i>H. seropedicae</i> .....   | 64 |
| FIGURA 17 EFEITO DO TIPO DE SAL (KCl E NaCl) E DO TAMPÃO (Tris-HCl E NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) NA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE <i>H. seropedicae</i> ..... | 66 |
| FIGURA 18 EFEITO DO MÉTODO DE LISE E DA TEMPERATURA DE INDUÇÃO SOBRE A SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE <i>H. seropedicae</i> .....                                     | 67 |
| FIGURA 19 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl E DO pH SOBRE A SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE <i>H. seropedicae</i> .....   | 69 |
| FIGURA 20 PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA GlnD-HIS DURANTE A PURIFICAÇÃO NA COLUNA HI-TRAP CHELATING.....  | 73 |
| FIGURA 21 ELETROFORESE DA PROTEÍNA GlnD-HIS PURIFICADA NA COLUNA DE AFINIDADE.....   | 74 |
| FIGURA 22 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMOSTRAS ELUÍDAS NA COLUNA DEAE-SEPHAROSE DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE <i>H. seropedicae</i> .....                     | 76 |
| FIGURA 23 ELETROFORESE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA PURIFICADA NA COLUNA DE TROCA IÔNICA.....   | 77 |

## LISTA DE TABELAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> EM PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS.....                  | 6  |
| TABELA 2 | ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....   | 31 |
| TABELA 3 | ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES FINAIS.....  | 33 |
| TABELA 4 | LISTA DOS TAMPÕES TESTADOS E DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD E GlnD-His DE <i>H. seropedicae</i> ..... | 44 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                              |   |
|------------------------------|---|
| ADP                          | 5' difosfato de adenosina                     |
| AMP                          | 5' monofosfato de adenosina                   |
| Amp                          | ampicilina                                    |
| ATase                        | enzima adenililtransferase                    |
| ATP                          | 5' trifosfato de adenosina                    |
| BSA                          | soro albumina bovina                          |
| CMP                          | 5' monofosfato de citosina                    |
| DNA                          | ácido desoxiribonucléico                      |
| D.O.                         | densidade ótica                               |
| DTT                          | ditiotreitól                                  |
| e <sup>-</sup>               | elétron                                       |
| EPS                          | exopolissacarídeo                             |
| F                            | faraday                                       |
| FPLC                         | <i>fast performance liquid chromatography</i> |
| GMP                          | 5' monofosfato de guanosina                   |
| GOGAT                        | glutamato sintase                             |
| GS                           | glutamina sintetase                           |
| IPTG                         | β-D-isopropil-tio-galactopiranosídeo          |
| kDa                          | kilodalton                                    |
| kΩ                           | kilo-ohms                                     |
| kV                           | kilo volts                                    |
| m/v                          | massa por volume                              |
| nm                           | nanômetro                                     |
| NADH                         | nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido   |
| NAD <sup>+</sup>             | nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado    |
| mRNA                         | ácido ribonucléico mensageiro                 |
| N <sub>2</sub>               | di-nitrogênio                                 |
| NH <sub>3</sub>              | amônia  |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | amônio  |
| O <sub>2</sub>               | gás oxigênio                                  |
| ORF                          | <i>open reading frame</i>                     |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| PAGE                          | <i>polyacrylamide gel electroforesis</i>                     |
| pb                            | pares de bases   |
| PCR                           | <i>polimerase chain reaction</i>                             |
| PHB                           | poli-3-hidroxi-butirato                                      |
| Pi                            | pirofosfato  |
| pO <sub>2</sub>               | pressão parcial de oxigênio                                  |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | íon fosfato  |
| psi                           | <i>pounds per square inch</i> (peso polegada quadrada)       |
| rbs                           | <i>ribosome binding site</i> (sítio de ligação ao ribossomo) |
| rpm                           | rotações por minuto  |
| Sm                            | estreptomicina   |
| RNA                           | ácido ribonucléico   |
| rRNA                          | ácido ribonucléico ribossomal                                |
| RJ                            | Rio de Janeiro   |
| TEMED                         | N,N,N',N' - tetrametil etilenodiamina                        |
| Tris                          | tris(hidroxi-metil)-aminometano                              |
| Tc                            | tetraciclina   |
| snRNA                         | <i>small nuclear RNA</i> (RNA pequeno encontrado no núcleo)  |
| tRNA                          | ácido ribonucléico transportador                             |
| U                             | unidade enzimática   |
| UDP                           | 5' difosfato de uracila                                      |
| UMP                           | 5' monofosfato de uracila                                    |
| UR                            | enzima removedora de uridilil                                |
| Utase                         | uridililtransferase  |
| UTP                           | 5' trifosfato de uracila                                     |
| UV                            | ultra-violeta  |

## RESUMO

O *Herbaspirillum seropedicae* é um diazotrofo endofítico encontrado dentro de raízes, caules e folhas de diversas gramíneas de interesse agrícola. Essa bactéria é capaz de fixar nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbicas e na ausência de amônio. Em *H. seropedicae* o sistema Ntr participa da regulação da expressão da proteína NifA, ativadora transcricional dos genes responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico. A proteína GlnD possui um papel chave na regulação do sistema Ntr atuando como um sensor dos níveis de nitrogênio intracelular e controlando o estado de uridililação da proteína GlnB, uma das proteínas envolvidas na cascata de regulação da fixação de nitrogênio. O gene *glnD* foi amplificado a partir do DNA genômico do *H. seropedicae* utilizando oligonucleotídeos sintetizados. A seqüência do gene *glnD* de *H. seropedicae* foi obtida do Banco de Dados do Projeto de Sequenciamento Genômico do *H. seropedicae* - GENOPAR (Programa Genoma do Paraná). O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM-T e sub-clonado nos vetores de expressão pET28b(+) e pET29a(+) originando os plasmídeos pGH1 e pGH2, capazes de superexpressar a proteína GlnD ligada a uma cauda N-terminal de histidinas (GlnD-His) e na sua forma nativa (GlnD), respectivamente. As condições de expressão das proteínas GlnD e GlnD-His na estirpe duplo-mutante *glnB<sup>-</sup>* e *glnD<sup>-</sup>* de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) foram otimizadas. Para aumentar a quantidade de proteína solúvel foi investigado o efeito de diferentes fatores na composição do tampão de lise das células. A proteína GlnD-His foi purificada por cromatografia de afinidade numa coluna de afinidade (HiTrap-Chelating-Ni<sup>+2</sup>) em uma única etapa. A proteína GlnD nativa foi parcialmente purificada por cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sepharose) em um sistema de FPLC.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio compreende um processo, executado por certas bactérias, no qual o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) de baixa reatividade é convertido em amônia ( $NH_3$ ). Tais bactérias são denominadas diazotróficas: organismos capazes de crescer com  $N_2$  atmosférico como única fonte de nitrogênio. Algumas destas bactérias podem estar em íntima associação com plantas de interesse econômico (JAMES e OLIVARES, 1998).

O nitrogênio é essencial para o desenvolvimento dos vegetais e constitui um macroelemento limitante para a produtividade das plantas de interesse agrônomo (HARDY e HAVELKA, 1975). Na atmosfera encontra-se na sua forma nativa ( $N_2$ ), uma forma química que não pode ser utilizada diretamente pelas plantas. As plantas podem adquirir nitrogênio diretamente do solo na forma de nitrato, amônia, uréia ou aminoácidos (WILLIAMS e MILLER, 2001).

No processo de decomposição da matéria orgânica o nitrogênio liberado na sua forma amoniacal é rapidamente oxidado a nitrato por bactérias quimioossintetizantes dos gêneros *Nitrossomas* e *Nitrobacter*. Salvo condições do solo que inibem a atividade dessas bactérias (pH muito ácido, altas concentrações de fenóis ou anoxia) a amônia não é oxidada e algumas plantas conseguem absorver nesta forma (HARDY e HAVELKA, 1975). Na forma de nitrato, a absorção direta do solo é dificultada devido à presença de colóides com carga superficial negativa, fazendo com que o nitrato seja rapidamente lixiviado pela percolação da água (HARDY e HAVELKA, 1975). Isso faz com que o nitrogênio fixado seja, em geral, fator limitante para o crescimento das plantas.

### 1.1.1 Importância Econômica e Ambiental

A reorientação na década de 1980 das políticas agrícolas tradicionais, essencialmente voltadas ao aumento da produtividade, foi marcada pela emergência de novos temas, com destaque para a questão ecológica e a sustentabilidade na agricultura. A agricultura sustentável está apoiada em um tripé caracterizado por: viabilidade econômica (obtenção de renda suficiente para que o manejo continue atrativo), equilíbrio ecológico (manutenção em longo prazo dos recursos naturais com o mínimo impacto ambiental) e equidade social (no que se refere à distribuição de benefícios e custos bem como aos valores sociais e culturais da população envolvida). Desde então, a pesquisa na área agrícola tem se esforçado para atingir tais características.

Um fator essencial para a agricultura sustentável é o aproveitamento eficiente do nitrogênio atmosférico (GRAHAM e VANCE, 2000). A utilização de fertilizantes químicos nitrogenados em plantas não-leguminosas constitui um dos maiores custos na agricultura atual (DÖBEREINER, 1992). Além disso, estudos comprovam que o emprego desses químicos causa danos ao meio-ambiente, tais como: a emissão de óxidos nitrosos tóxicos, acidificação do solo, eutrofização de lagos e rios, dentre outros (HOWARTH *et al.*, 2000).

A fixação biológica de nitrogênio ainda possui papel fundamental no ciclo do nitrogênio porque contribui para o conteúdo global de nitrogênio da biosfera e compensando as perdas ocasionadas pelo processo de desnitrificação (GRAHAM e VANCE, 2000).

### 1.1.2 Bactérias Diazotróficas de Plantas Não-leguminosas

As bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas podem ser agrupadas em 3 categorias: microrganismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (BALDANI *et al.*, 1997). Na primeira categoria estão agrupadas as espécies que colonizam a porção superficial das raízes. Na segunda categoria estão aquelas capazes de colonizar tanto internamente quanto externamente as raízes, enquanto que no terceiro grupo, tido como de maior



importância, estão as bactérias que colonizam o interior de raízes e porções aéreas das plantas. Segundo Kloepper *et al.* (1992), o termo endofítico refere-se às bactérias presentes dentro dos tecidos internos da epiderme. A vantagem dos microrganismos endofíticos está no potencial para fixar nitrogênio em níveis máximos, pois estes estão situados em nichos mais protegidos do oxigênio e de outros fatores inibitórios, tal como a competição microbiana.

Nos diazotrofos, a amônia, resultante da redução do N<sub>2</sub> atmosférico pela nitrogenase, é rapidamente incorporada ao metabolismo bacteriano. Sua acumulação no citoplasma é tóxica para a célula, pois pode atuar como um desacoplador de membrana (GIVAN, 1979). Nestas condições, o excesso de amônia é liberado para o meio extracelular onde pode ser captado pelas plantas associadas com essas bactérias. Explorar a ocorrência natural da associação simbiótica bactéria-planta é uma alternativa interessante e viável para ampliar o fornecimento de nitrogênio para as plantas de importância econômica (DÖBEREINER, 1992).

## 1.2 O GÊNERO *Herbaspirillum*

### 1.2.1 Histórico

Durante um levantamento realizado no estado do Rio de Janeiro sobre a ocorrência de novas espécies bacterianas presentes na rizosfera e no interior das raízes de cereais, Baldani (1984a) obteve isolados que, apesar de serem menores e menos móveis, assemelhavam-se com as espécies anteriormente redescobertas e descritas do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER e DAY, 1975). Tendo como base algumas características fisiológicas, de crescimento em meio semi-sólido (NFb malato), do conteúdo de guanina e citosina (G+C) da seqüência de DNA e de ensaios de hibridização DNA-RNA ribossomal, os novos isolados indicaram um possível parentesco com os gêneros *Azospirillum* e *Aquaspirillum*; proposta que chegou a ser feita por Baldani *et al.* (1984b). No entanto, tal hipótese foi posteriormente descartada pelos resultados obtidos através dos experimentos de hibridização RNA-RNA realizados por Falk *et al.* (1986), que mostraram baixos

níveis de complementaridade de RNA (menos que 25%) quando 2 isolados foram comparados com 3 espécies do gênero *Azospirillum*.

Deste modo, foram propostos o gênero *Herbaspirillum* (do latim *herba*: planta herbácea portadora de sementes; *spirillum*: pequena espiral) e a espécie *Herbaspirillum seropedicae*; sendo que o segundo nome se refere a cidade de Seropédica (RJ), Brasil, local onde a bactéria foi inicialmente isolada (BALDANI *et al.*, 1986).

A partir dos anos 90, novas espécies foram acrescentadas ao gênero *Herbaspirillum*. A bactéria *Pseudomonas rubrisubalbicans* foi reclassificada, tendo como apoio dados de hibridização DNA:rRNA, como uma nova espécie do gênero *Herbaspirillum*, o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996). O *Herbaspirillum frisingense* foi adicionado ao gênero baseado em propriedades fisiológicas, análise filogenética do gene 16S rDNA e hibridização DNA:DNA (KIRCHHOF *et al.*, 2001). Alta similaridade da seqüência 16S rDNA de isolados do nódulo de raízes de *Phaseolus vulgaris* (feijão) com outros membros do gênero *Herbaspirillum* auxiliaram na classificação do *Herbaspirillum lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2003).

O *Herbaspirillum putei*, uma bactéria espiral isolada da água de poço, foi adicionada ao gênero e apresentou homologia na seqüência 16S rDNA com as bactérias reclassificadas [*Pseudomonas*] *huttiense* (atual *Herbaspirillum huttiense*) e [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* (atual *Herbaspirillum autotrophicum*) (DING e YOKOTA, 2004). Baseado em características fenotípicas, quimiotaxonomias e na análise da seqüência 16S rDNA, a bactéria capaz de degradar 4-clorofenol, anteriormente designada como *Comamonas testosteron*, foi reclassificada como *Herbaspirillum chlorophenolicum* (IM *et al.*, 2004).

### 1.2.2 *Herbaspirillum seropedicae*

O *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, com forma geralmente vibríóide e algumas vezes helicoidal. A célula possui diâmetro de 0,6 a 0,7 µm e comprimento que pode variar de 1,5 – 5 µm dependendo do meio no qual é cultivada. Pode apresentar de 1 a 3 flagelos em um dos pólos, ou 1 flagelo em

ambos os pólos e possui grande mobilidade em ambientes ricos em oxigênio. É positiva para catalase, oxidase e urease. Cresce bem com N<sub>2</sub> como única fonte de nitrogênio e tolera ampla faixa de pH (5,3 – 8,0).

Possui capacidade de oxidar diversas fontes de carbono e fixa nitrogênio atmosférico em ambientes microaerófilos (BALDANI *et al.*, 1986). Difere das espécies do gênero *Azospirillum* pelo seu menor tamanho, por apresentar mais de 1 flagelo, pela maior tolerância ao pH (5,3 a 8,0) e pela atividade nitrogenase mais tolerante ao oxigênio (pO<sub>2</sub> de até 3% contra 2% das espécies de *Azospirillum*), e por ter um conteúdo de G+C inferior em comparação com as bactérias do gênero *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1986).

A modificação dos componentes do meio semi-sólido NFb em relação ao pH, presença de vitaminas e a concentração de fosfatos, facilitou o isolamento do *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1992). Com base na homologia de rRNA, característica atual vigente para classificação dos microrganismos, o *Herbaspirillum seropedicae* é classificado como membro pertencente à subdivisão β das Proteobactérias (YOUNG, 1992).

### 1.2.3 Distribuição Ecológica e Associações Simbióticas das Espécies do Gênero *Herbaspirillum*

Como outras bactérias endófitas, o *H. seropedicae* possui baixa sobrevivência em solos naturais (OLIVARES *et al.*, 1996). Todavia é menos afetado em solos estéreis, indicando que fatores bióticos (competição microbiana, por exemplo) interferem na sobrevivência dessa bactéria no solo nativo (OLIVARES *et al.*, 1996). O *H. seropedicae* pode colonizar plantas pelas sementes, pela propagação vegetativa e pelo material vegetal morto (BALDANI *et al.*, 1992, OLIVARES *et al.*, 1996). As espécies do gênero *Herbaspirillum* colonizam espécies vegetais distribuídas entre vários táxons do grupo dos cereais, gramíneas e outras plantas. A TABELA 1 sumariza a ocorrência dos principais representantes do gênero encontrados em plantas não-leguminosas e capazes de fixar N<sub>2</sub> atmosférico.

**TABELA 1.** DISTRIBUIÇÃO ECOLÓGICA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO *Herbaspirillum* EM PLANTAS NÃO-LEGUMINOSAS

| Espécies de <i>Herbaspirillum</i>      | Planta                                    | Região da planta                                  | Referência  |
|--|---|---|---|
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i>      | trigo                                     | <sup>1</sup> superfície das raízes e rizosfera    | <sup>1</sup> BALDANI <i>et al.</i> , 1986   |
|  | milho                                     |   | <sup>2</sup> OLIVARES <i>et al.</i> , 1996  |
|  | sorgo                                     | <sup>2</sup> tecido vascular                      | JAMES <i>et al.</i> , 1997  |
|  | arroz                                     | de folhas   |   |
|  | cana-de-açúcar                            | <sup>1</sup> caule, folhas<br><sup>2</sup> raízes | <sup>1</sup> OLIVARES <i>et al.</i> , 1996<br><sup>2</sup> JAMES <i>et al.</i> , 1998 |
|  | algumas espécies de gramíneas forrageiras | superfície de raízes e rizosfera                  | OLIVARES <i>et al.</i> , 1996<br>BALDANI <i>et al.</i> , 1992                         |
|  | palmeiras oleaginosas                     | rizosfera   | FERREIRA <i>et al.</i> , 1995   |
| <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> | cana-de-açúcar                            | raízes, tecido vascular, folhas                   | OLIVARES <i>et al.</i> , 1996   |
|  | palmeiras oleaginosas                     | rizosfera   | FERREIRA <i>et al.</i> , 1995   |
|  | arroz                                     | rizosfera   | BALDANI <i>et al.</i> , 1992  |
|  | sorgo                                     | tecido vascular de folhas                         | JAMES <i>et al.</i> , 1997  |
|  | dicotiledôneas: bananeira e abacaxizeiro  | rizosfera   | WEBER <i>et al.</i> , 1999<br>MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2001                          |
| <i>Herbaspirillum frisingense</i>      | plantas fibrosas C-4                      | rizosfera   | KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001   |

A colonização e os benefícios da interação entre espécies do gênero *Herbaspirillum* e o arroz foram estudados em alguns trabalhos (ELBELTAGY *et al.*, 2001, JAMES *et al.*, 2002). Quando variedades de arroz tolerantes ao alumínio foram colonizadas pela estirpe de *H. seropedicae* Z67 ocorreu o aumento do crescimento e acumulação de nitrogênio nessas plantas (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Outros estudos mostraram que a estirpe de *H. seropedicae* (LR15) inoculada em arroz foi capaz de colonizar a superfície das raízes e os tecidos internos, além de

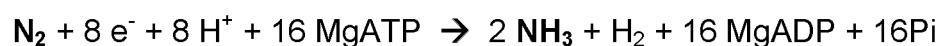
estimular o aumento do crescimento das raízes dessas plantas (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

#### 1.2.4 Outros Benefícios Relacionados ao *H. seropedicae*

A microscopia eletrônica realizada após o congelamento das células sob alta pressão, mostrou que em raízes e folhas de cana-de-açúcar o *H. seropedicae* é capaz de produzir numerosos grânulos do pómero poli-3-hidroxitirato (PHB) (SILVA *et al.*, 2003). Devido a suas características biodegradáveis e biocompatíveis, o PHB pode ser aplicado em diversas áreas da indústria (LEE, 1996). Em plantas de cana-de-açúcar e sorgo colonizadas por *H. seropedicae*, foi observado a produção e liberação de exopolissacarídeos (EPS) com características farmacêuticas (JAMES *et al.*, 1997).

### 1.3 COMPLEXO ENZIMÁTICO DA NITROGENASE

A conversão biológica de N<sub>2</sub> atmosférico em amônia é realizada por um complexo de metaloenzimas, denominado complexo enzimático da nitrogenase, que fornece a maquinaria necessária para a fixação de nitrogênio (SMITH e EADY, 1992). Tal conversão é representada pela seguinte reação (segundo SIMPSON e BURRIS, 1984):



O complexo enzimático convencional da nitrogenase é formado por duas metaloenzimas nomeadas de acordo com o metal que as compõem: a proteína ferro (Fe), uma proteína homodimérica que atua como doadora de elétrons dependente de ATP para o outro componente do complexo, a proteína ferro-molibidênio (MoFe), uma proteína heterotetramérica que contém o sítio catalítico da enzima (DEAN *et al.*, 1993). A proteína MoFe possui dois núcleos redox diferentes: o núcleo P (8Fe-7S), e

o cofator FeMo (MoFe<sub>7</sub>S<sub>9</sub>.homocitrato), responsável pela redução do substrato (EINSLE *et al.*, 2002).

O mecanismo enzimático da nitrogenase requer três etapas de transferência de elétrons: a redução da proteína Fe por doadores de elétrons (flavodoxina ou ferredoxina), a transferência de elétrons (Mg.ATP-dependente) da proteína Fe para o núcleo P da proteína MoFe, e finalmente, transferência interna de elétrons do núcleo P para o cofator FeMo. Cada transferência de elétrons entre a proteína Fe e a proteína MoFe requer um ciclo de associação ou dissociação do complexo protéico. Estes ciclos possuem papel crucial no mecanismo de acoplamento da hidrólise do ATP com a transferência de elétrons (HAGEMAN e BURRIS, 1978).

A formação de amônia a partir de N<sub>2</sub> atmosférico e a síntese do complexo da nitrogenase despendem muita energia. Isso faz com que ambos processos sejam altamente regulados nos diazotrofos. Em termos de atividade, o oxigênio e a amônia são elementos regulatórios importantes uma vez que o complexo da nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio e têm sua atividade inibida *in vivo* em altas concentrações intracelulares de amônia (HOWARD e REES, 1996; POSTGATE, 1982). Essa sensibilidade se reflete no âmbito transcricional, onde o nível de expressão do complexo da nitrogenase a partir dos genes *nif* é altamente regulado em muitos organismos pelo oxigênio e pela amônia (POSTGATE, 1982).

Em adição à regulação transcricional, alguns organismos desenvolveram um mecanismo de controle pós-traducional da nitrogenase. O *A. brasilense*, por exemplo, possui um mecanismo de inativação reversível da nitrogenase através da ADP ribosilação da proteína Fe (ZHANG *et al.*, 1992). Na presença de amônio, a enzima dinitrogenase ADP-ribosil transferase (DRAT) faz a transferência do grupamento ADP-ribose para um resíduo específico (Arg-101) da proteína Fe. Em níveis baixos de nitrogênio, o grupamento é removido pela enzima glicohidrolase ativadora de dinitrogenase redutase (DRAG) restaurando a atividade da nitrogenase (ZHANG *et al.*, 1993).

A inibição da nitrogenase pelos íons amônio em *H. seropedicae* não envolve a modificação da proteína-ferro por ADP-ribosilação. Não foram verificadas modificações na proteína Fe e nem a presença de possíveis genes homólogos aos genes *draT* e *draG* no genoma dessa bactéria (FU e BURRIS *et al.*, 1989). Um estudo realizado sobre os efeitos de compostos nitrogenados na atividade da

nitrogenase de *H. seropedicae* mostrou que alguns aminoácidos positivamente carregados (histidina, lisina, arginina) não são capazes de promover o desligamento (*switch-off*) da nitrogenase e não são utilizados como única fonte de nitrogênio, devido provavelmente, a ausência de um sistema específico de transporte para esses aminoácidos (KLASSEN *et al.*, 1997).

#### 1.4. OS GENES *nif*

Em vários organismos os genes *nif* são os genes necessários para a síntese das proteínas estruturais da nitrogenase, dos genes reguladores de transcrição (*nifL* e *nifA* dependendo do organismo), transportadores de elétrons, e dos genes de maturação dos componentes da nitrogenase. O controle da expressão desses genes, organização estrutural e distribuição no genoma evoluíram através do tempo de acordo com as diferentes adaptações e necessidades fisiológicas dos microrganismos.

Em *K. pneumoniae*, os genes *nif* estão organizados em 8 *operons* contíguos num único agrupamento contendo seqüências que codificam as proteínas estruturais do complexo da nitrogenase (*nifHDK*), genes responsáveis pela síntese dos núcleos Fe-S e cofator FeMo (*nifEN nifBQ nifH nifV nifX*), pelas modificações pós-traducionais (*nifUSW nifZM*), pelo fornecimento de elétrons para a nitrogenase (*nifJ nifF*) além daqueles responsáveis pela regulação dos genes *nif* (*nifLA*) (MERRICK, 1988). Nesta bactéria, a proteína NifA (produto do gene *nifA*) é a ativadora da transcrição de todos os genes *nif*, e tem sua atividade regulada por NifL (produto do gene *nifL*) na presença de amônio e oxigênio (MERRICK, 1988).

Em *H. seropedicae* os genes *nif* foram seqüenciados e estão organizadas em um único grupamento de genes contendo os genes *nifAnifB* e *nifHDKENXorf1orf2orf3* (SOUZA *et al.*, 1991b; MACHADO *et al.*, 1996; KLASSEN *et al.*, 1999).

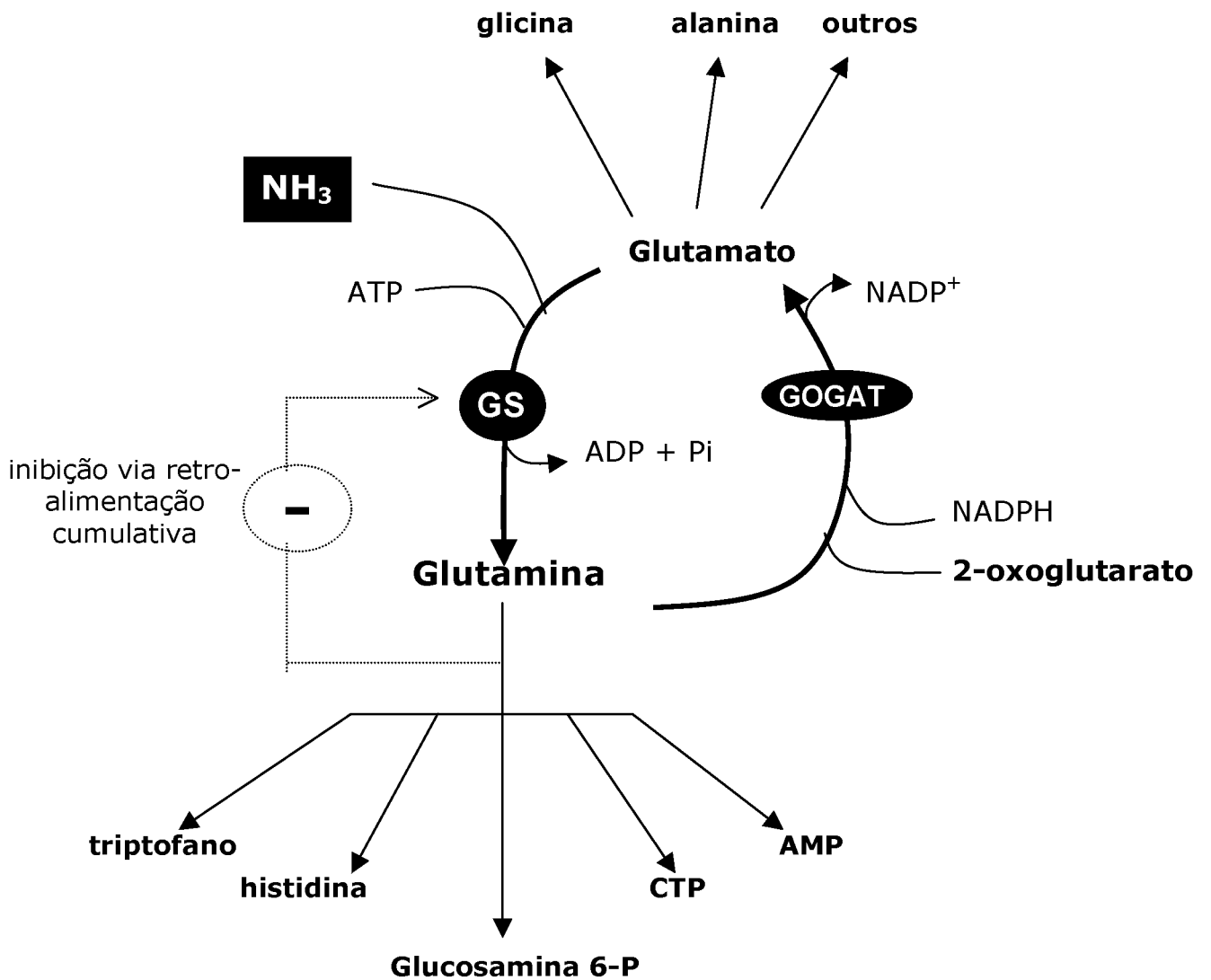
## 1.5 ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM BACTÉRIAS

O amônio é o composto nitrogenado de mais fácil utilização na maioria das bactérias (MERRICK e EDWARDS, 1995). A enzima glutamina sintetase (GS) catalisa a formação de glutamina a partir de glutamato e amônio. Em conjunto com a enzima glutamato sintase (GOGAT), que produz glutamato a partir de glutamina e 2-oxoglutarato, forma a principal via de assimilação do amônio (FIGURA 1). A glutamina é um intermediário metabólico de fundamental importância para o organismo, pois está envolvida na biossíntese de todos os aminoácidos, nucleotídeos púricos, pirimidínicos e glucosamina 6-P, que constituem componentes macromoleculares essenciais na célula, como proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos complexos.

A manutenção do balanço de nitrogênio intracelular é em grande parte devido à enzima GS, que por sua vez é controlada tanto ao nível de atividade quanto ao nível transcricional (MERRICK e EDWARDS, 1995). Além desses mecanismos reguladores, a atividade de GS pode também ser controlada por retro-alimentação cumulativa (WOOLFOLK e STADTMAN, 1967) (FIGURA 1).



FIGURA 1. ESQUEMA DEMONSTRANDO A VIA DE ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO (GS E GOGAT) EM *E. coli* E A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE GS VIA RETRO-ALIMENTAÇÃO CUMULATIVA



### 1.5.1 Glutamina Sintetase

Em *E. coli*, a enzima GS é codificada pelo gene *glnA* que faz parte de um mesmo *operon* com outros 2 genes que codificam reguladores importantes: *ntrB* (que produz NtrB) e *ntrC* (que produz NtrC) formando o *operon glnAntrBC* (BACKMAN *et al.*, 1981). A partir desse *operon*, essas proteínas podem ser transcritas em um nível basal constitutivo sob condições de excesso de nitrogênio fixado, ou numa taxa maior, em excassez de nitrogênio fixado intracelular, a partir de promotores dependentes dos fatores da RNA polimerase  $\sigma^{70}$  e  $\sigma^{54}$ , respectivamente (HUNT e MAGASANIK, 1985). Em *E. coli* e na maioria das bactérias somente uma forma de GS (GSI) está presente. Porém, em certas bactérias principalmente do gênero *Rhizobium* podem ser encontradas outras formas de GS (GSII e GSIII) (ESPIN *et al.*, 1990, SHATTERS *et al.*, 1993).

A GS de *E. coli* é composta de 12 subunidades idênticas organizadas em dois hexágonos superpostos (CHUNG e RHEE, 1984). A modificação pós-traducional de GS (adenililação) pela enzima GlnE resulta na sua inativação, caracterizada pela ligação covalente de um grupamento adenilil a um resíduo específico de tirosina (Tyr-397) em cada uma de suas 12 subunidades (SHAPIRO *et al.*, 1967; BERLETT *et al.*, 1998). Desta forma, GS pode estar presente em vários graus de adenililação, sendo sua atividade catalítica inversamente proporcional ao número médio de grupos adenilil covalentemente ligados à molécula. Quando está adenililada, GS possui menor atividade catalítica, requer  $Mn^{+2}$  como cátion divalente e é mais susceptível à inibição por retro-alimentação que a enzima deadenililada (STADTMAN *et al.*, 1980).

A proteína GlnE é uma enzima bifuncional que possui o domínio conservado nucleotidiltransferase, que está presente em duas cópias (ARAVIND e KOONIN, 1999a). A formação de 2 proteínas truncadas com os domínios separados mostrou que as duas atividades antagonistas da proteína (adenililação e deadenililação) estão em porções separadas na proteína (JAGGI *et al.*, 1997). O domínio N-terminal da GlnE deadenilila GS, sendo regulado por GlnB-UMP e 2-oxoglutarato; enquanto que o domínio C-terminal adenilila GS de forma dependente de glutamina e GlnB (CABAN e GINSBURG, 1976; JAGGI *et al.*, 1997; RHEE *et al.*, 1985).

## 1.6 O SISTEMA Ntr: SISTEMA DE REGULAÇÃO DE NITROGÊNIO

### 1.6.1 Cascatas Regulatórias

Os organismos precisam adaptar-se constantemente as mudanças no meio nutricional para crescerem e reproduzirem. A eficiência desses processos é garantida por um sistema altamente sofisticado capaz de captar e medir essas variações com precisão, para que então respostas apropriadas possam ser executadas rapidamente.

Sistemas acoplados em cascatas cíclicas são dotados de um grande potencial regulatório, pois: (a) são capazes de amplificar o sinal de um dado efetor mesmo que este esteja presente em concentrações extremamente baixas, (b) possuem uma resposta rápida, facilitando a mudança de um estado metabólico para outro, (c) são capazes de gerar grande cooperatividade entre todos os seus componentes, promovendo desta forma a integração dos sistemas metabólicos (CHOCK e STADTMAN, 1977) e (d) permitem um ajuste fino de suas respostas frente a pequenas mudanças (MANGUM *et al.*, 1973).

### 1.6.2 Cascata Regulatória do Sistema Ntr

#### 1.6.2.1 Organização e Composição

O sistema Ntr compreende um conjunto de enzimas que controla o metabolismo nitrogenado em bactérias. As enzimas que compõem esse sistema estão presentes em diferentes concentrações na célula e arranjadas num complexo mecanismo em cascata (MERRICK e EDWARDS, 1995). Em *E. coli*, o sistema Ntr é formado pelas seguintes enzimas: **glutamina sintetase (GS)** (produto do gene *glnA*), **NtrB** (codificada pelo gene *ntrB*), **NtrC** (codificada pelo gene *ntrC*), **GlnD** ou uridililtransferase (codificada pelo gene *glnD*), **GlnE** ou ATase (codificada pelo gene *glnE*), **GlnB** (produto do gene *glnB*) e **GlnK** (produto do gene *glnK*); sendo as duas últimas pertencentes à família das proteínas transdutoras de sinal PII.

Na célula, esse conjunto de enzimas e proteínas tem função de desencadear respostas apropriadas tanto ao nível de regulação da transcrição quanto de controle da atividade de proteínas relacionadas com o metabolismo nitrogenado. Estas respostas dependem de sinais que refletem as condições intracelulares de nitrogênio e carbono e da transmissão destes sinais para outras proteínas (ENGLEMAN e FRANCIS, 1978).

A proteína GlnD possui um papel chave na regulação do sistema Ntr atuando como um sensor dos níveis de nitrogênio intracelular e controlando o estado de uridililação da proteína GlnB (ENGLEMAN e FRANCIS, 1978; ATKINSON *et al.*, 1994). A proteína GlnB por sua vez, regula indiretamente a transcrição do *operon* Ntr (formado pelo *operon glnAntrBC*) e controla a enzima glutamina sintetase pela sua interação com as proteínas NtrB e GlnE, respectivamente (NINFA e MAGASANIK, 1986; BUENO *et al.*, 1985).

A proteína NtrB é uma histidina quinase pertencente ao sistema regulatório de dois componentes. Esse sistema é caracterizado por apresentar uma proteína com domínio C-terminal transmissor e outra proteína com domínio N-terminal receptor (BURBULYS *et al.*, 1991). O domínio C-terminal da NtrB é responsável pela atividade quinase/fosfatase e seu domínio N-terminal está relacionado com a interação com a proteína GlnB (KAMBEROV *et al.*, 1994b). Na ausência de GlnB, a proteína NtrB se liga ao ATP e catalisa sua auto-fosforilação em um resíduo de histidina altamente conservado (His-139). Em seguida, esse grupamento fosforil pode ser transferido a um resíduo de aspartato conservado na porção N-terminal do outro elemento do sistema de dois componentes, a proteína NtrC (WEISS e MAGASANIK, 1988; NINFA e BENNETT, 1991).

A proteína NtrC é uma típica proteína ativadora transcricional de promotores dependentes do fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase (WEISS e MAGASANIK, 1988). Possui 3 domínios: de ligação ao DNA (C-terminal), de ativação transcricional com atividade ATPase (central) e um domínio de transdução de sinais (N-terminal) (WEISS *et al.*, 1991). A fosforilação de NtrC faz com que esta, antes presente na forma dimérica, forme um tetrâmero ou um oligômero com alta afinidade por DNA e que é capaz de ativar a transcrição de promotores  $\sigma^{54}$ -dependentes (AUSTIN e DIXON, 1992). Além da fosforilação via NtrB, NtrC-P também pode ser fosforilada pelo acetil-fosfato que pode ser formado pela enzima fosfotransacetilase (produto do gene *pta*) a

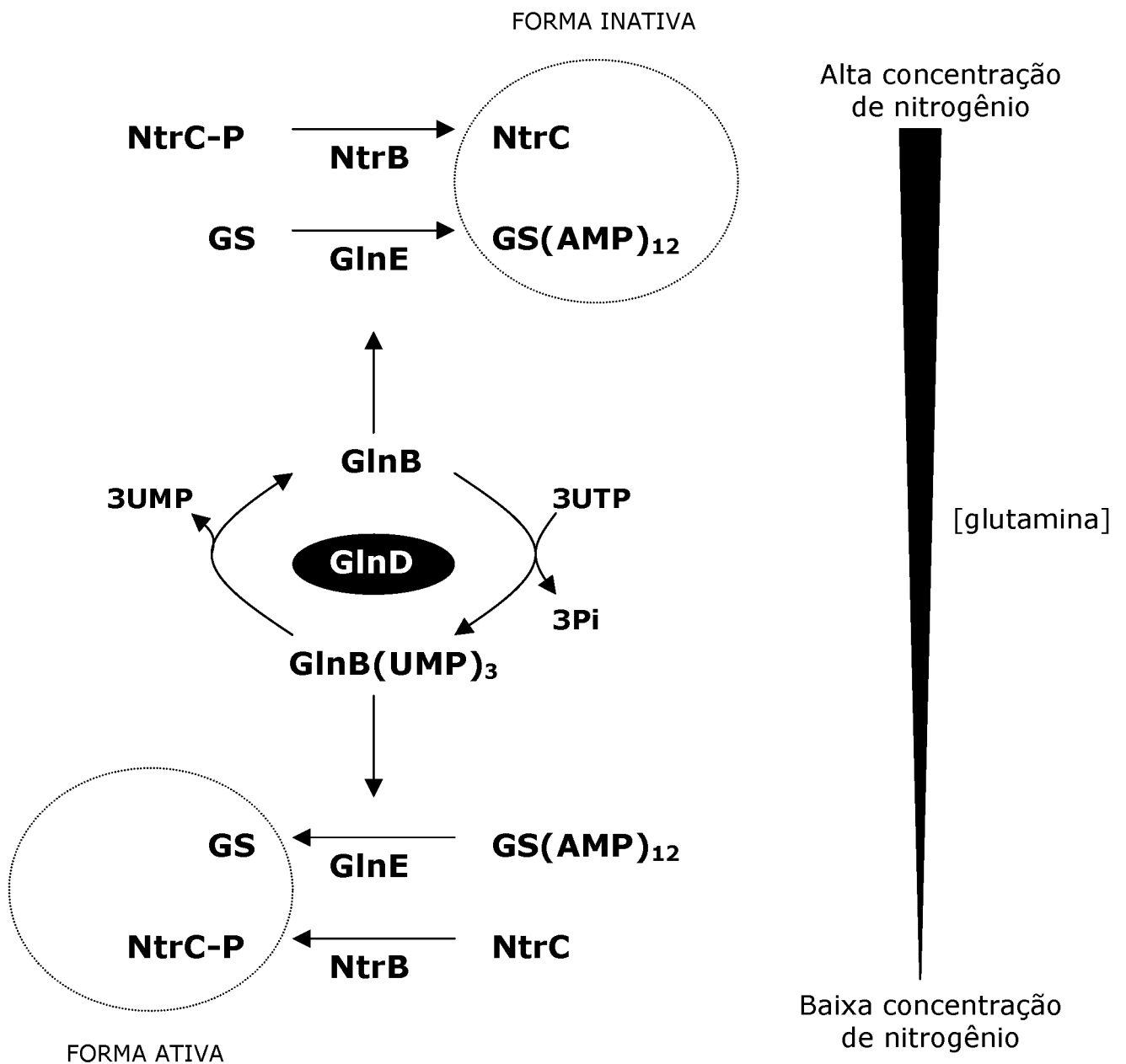
partir de acetil CoA e  $\text{PO}_4^{3-}$ , ou pela enzima acetato quinase (produto do gene *ackA*) a partir de acetato e ATP (FENG *et al.*, 1992; McCLEARY *et al.*, 1993).

#### 1.6.2.2 Funcionamento da Cascata Ntr em Enterobactérias

Em condições limitantes de nitrogênio, quando a concentração intracelular de glutamina é baixa, a proteína GlnD catalisa a uridililação da proteína GlnB (adição covalente de UMP), formando GlnB-UMP (ADLER *et al.*, 1975; JIANG *et al.*, 1998b). Em situação inversa, em altas concentrações de glutamina, a ligação de glutamina a proteína GlnD faz com que esta adquira atividade removedora de UMP e catalise a desuridililação de GlnB-UMP formando GlnB e UMP (KAMBEROV *et al.*, 1994a).

O estado de uridililação da proteína GlnB determina sua conformação e portanto a forma de interação com suas proteínas alvo. Em altos níveis de nitrogênio fixado, a atividade fosfatase de NtrB sobre NtrC-P é estimulada pela formação de um complexo entre NtrB e a forma não modificada de GlnB (NINFA e MAGASANIK, 1986). Ao mesmo tempo, a proteína GlnB pode interagir com a proteína GlnE, que promove a adenililação e conseqüente inativação de GS (BROWN *et al.*, 1971) (FIGURA 2). Em baixos níveis de nitrogênio fixado, GlnB é uridililada por GlnD. Nesta forma, GlnB-UMP não interage com NtrB que adquire atividade auto-fosfatase e transfere seu grupo fosforil para NtrC. O NtrC-P pode então ativar a transcrição a partir de promotores envolvidos no metabolismo nitrogenado, tais como *glnAp<sub>2</sub>* e *nifL* (NINFA e MAGASANIK, 1986; NINFA *et al.*, 1987) e simultaneamente, o complexo GlnE-GlnB-UMP catalisa a desadenililação da GS, ativando-a (BROWN *et al.*, 1971).

FIGURA 2. CASCATA REGULATÓRIA DO SISTEMA Ntr EM *Escherichia coli*



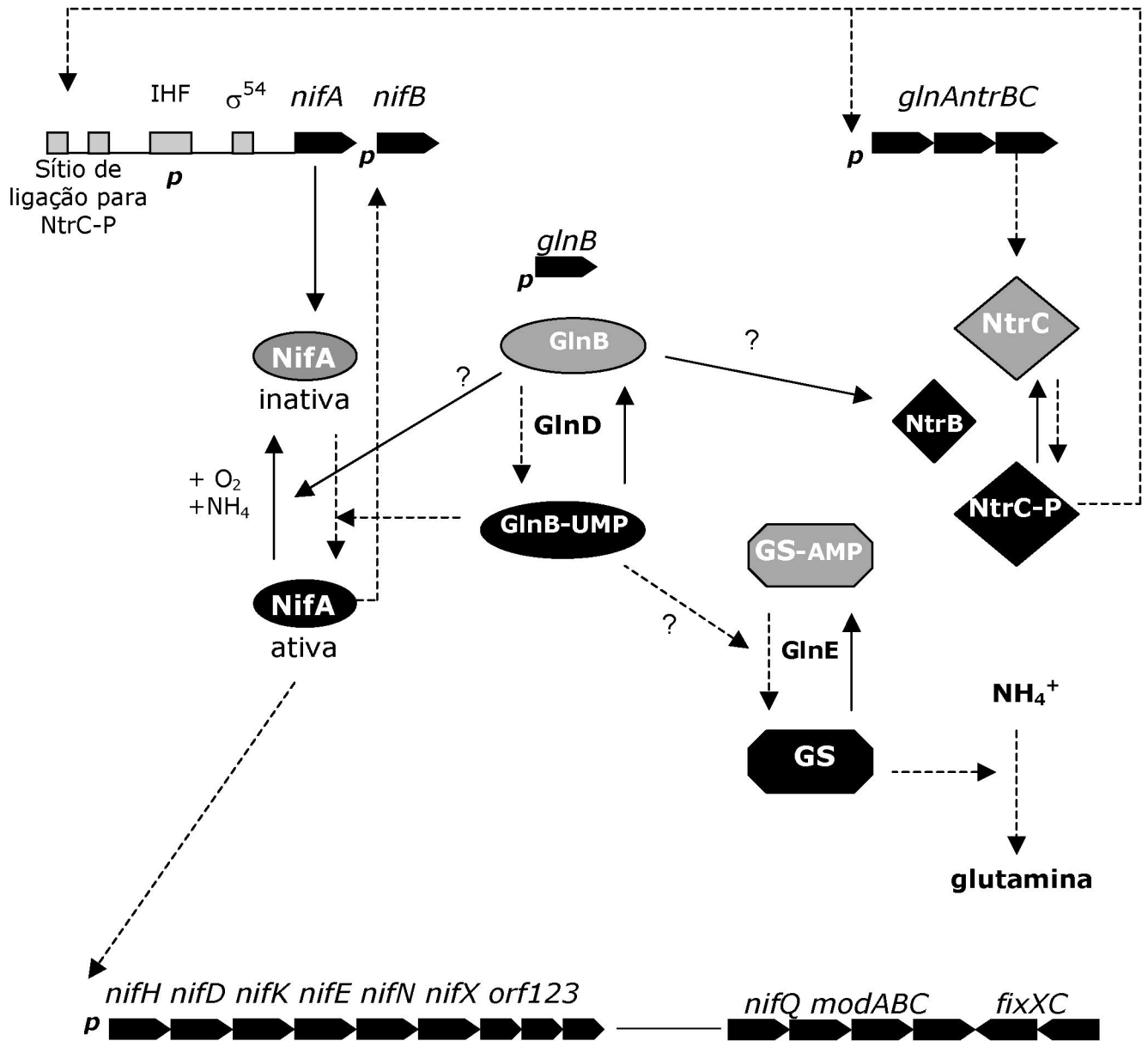
A proteína GlnD, em resposta aos níveis intracelulares de glutamina, determina o estado de uridililação da proteína GlnB, que regula indiretamente as atividades de NtrC e GS. Modificado a partir de Merrick e Edwards (1995).

## 1.7 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *H. seropedicae*

Em *H. seropedicae*, o sistema Ntr participa da regulação da expressão da proteína NifA, uma proteína ativadora transcricional dos genes *nif* (SOUZA *et al.*, 1991a) (FIGURA 3). A regulação da expressão do gene *nifA* em *H. seropedicae* é diferente daquela que ocorre em *K. pneumoniae* e *A. brasilense* (MERRICK e EDWARDS, 1995; FADEL-PICHETH *et al.*, 1999). Em *H. seropedicae*, o gene *nifA* é expresso a partir de uma região promotora contendo sítios de ligação para NtrC, NifA e IHF (*integration host factor*) situada a montante de uma seqüência dependente do promotor  $\sigma^{54}$  (-24/-12) (SOUZA *et al.*, 1991b; WASSEM *et al.*, 2000). A expressão de NifA depende da quantidade de nitrogênio fixado e tem pouca influência do oxigênio. A proteína NtrC é o principal ativador transcricional do gene *nifA*, sendo estimulado positivamente pela presença de IHF. O IHF por sua vez, compete com NifA pela ligação a sítio específico no DNA prevenindo a auto-ativação de NifA em condições de fixação de nitrogênio (WASSEM *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2000). Embora a proteína NifA não seja essencial para expressão de *nifA*, é possível que contribua para a sua máxima expressão a partir da região promotora (SOUZA *et al.*, 2000; WASSEM *et al.*, 2002).

Assim como em *A. brasilense*, não foi verificada no *H. seropedicae* a presença do gene *nifL*, sendo que a atividade de NifA é regulada em resposta aos níveis de O<sub>2</sub> e nitrogênio fixado (SOUZA *et al.*, 1999). Nos membros da Subdivisão  $\gamma$  das Proteobactérias, como *K. pneumoniae* ou *A. vinelandii*, a regulação da atividade de NifA é realizada pela proteína NifL, que forma um complexo inativo com NifA na presença de altos níveis de amônio ou oxigênio (BARRET *et al.*, 2001). Em *A. brasilense* a proteína GlnB é necessária para a atividade de NifA (ARSÈNE *et al.*, 1996). Em *H. seropedicae*, mutantes *glnB* apresentaram fenótipo Nif<sup>-</sup>, sugerindo que a proteína GlnB também esteja envolvida no controle da atividade de NifA (BENELLI *et al.*, 2000).

FIGURA 3. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E REGULAÇÃO DOS GENES *nif* EM *H. seropedicae*



Esquema da regulação de amônio em *H. seropedicae*. As linhas sólidas indicam excesso de  $NH_4^+$  e as linhas pontilhadas escassez de  $NH_4^+$ . O ponto de interrogação indica uma suposta interação entre as proteínas (adaptado a partir do esquema de PEDROSA *et al.*, 2001).



## 1.8 A PROTEÍNA GlnD

### 1.8.1 Histórico

A reconstituição *in vitro* do sistema de transdução de sinais começou de forma fascinante antes da era do DNA recombinante ou das avançadas técnicas de superexpressão de proteínas. No final da década de 60 e início da década de 70, os estudos relacionados com a enzima glutamina sintetase vão se consolidando e o quebra-cabeça, cujas peças correspondem às enzimas e os co-fatores envolvidos com a regulação da GS, começa a ser montado.

A descoberta da proteína GlnD e de suas atividades sobre a proteína GlnB começou com os estudos sobre as condições que estimulavam a formação de GlnB-UMP (BROWN *et al.*, 1971; MANGUM *et al.*, 1973). Brown *et al.* (1971) verificaram que na presença alguns cofatores (2-oxoglutarato, ATP, UTP, Mg<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup>) a conversão da forma GlnB para a forma GlnB-UMP, catalisada pela fração impura "PI" com atividade adenililtransferase, era de fato realizada por outra enzima que não a GlnE presente na mesma fração protéica. Porém, não se conhecia o caráter bifuncional da proteína GlnD e suas atividades de adição e remoção de UMP eram atribuídas a duas enzimas distintas: a uridililtransferase (UTase) e a uridilil-removedora (UR), respectivamente (MANGUM *et al.*, 1973).

Com a co-purificação parcial das duas atividades por Adler *et al.* (1975) e Francis e Engleman (1978), foi sugerido que as duas enzimas (UTase e UR) consistiam numa simples enzima bifuncional ou num complexo enzimático. Em concordância com essa hipótese, foi verificado que mutações pontuais que anulavam a atividade UTase causavam uma perda simultânea da atividade UR (FOOR *et al.*, 1978). Acrescentado a isto, ambas atividades eram retomadas simultaneamente nos revertentes espontâneos para o fenótipo (BANCROFT *et al.*, 1978; FOOR *et al.*, 1978). A posterior co-purificação de UTase e UR numa preparação homogênea com uma única cadeia polipeptídica confirmaram que as duas atividades são de uma única proteína (GARCIA E RHEE, 1983).

### 1.8.2 Relação da Proteína GlnD com a GS e o Sistema Ntr

No final da década de 70, vários estudos determinaram os efeitos das mutações no gene *glnD* em enterobactérias. Os mutantes *glnD* de *E. coli* (inserção do transposon *Tn10*), *K. aerogenes* e *S. typhimurium* (mutação por indução química) apresentaram vários graus de inativação de GS, representado pela auxotrofia parcial a glutamina (BLOOM *et al.*, 1978; GARCIA *et al.*, 1980; FOOR *et al.*, 1978; BANCROFT *et al.*, 1978). Atkinson e Ninfa (1992) sugeriram que esses mutantes possuíam atividade residual, sem inativação total das atividades de GlnD, ou ainda, que este fenótipo ocorreu devido a ocorrência de mutações supressoras aleatórias que ocorreriam numa certa frequência.

Mutações insercionais nos genes *glnD* de *K. pneumoniae* e *A. brasilense* causaram em ambas espécies o fenótipo Ntr<sup>-</sup>, caracterizado pela incapacidade dos mutantes em crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio (EDWARDS e MERRICK, 1995; van DOMMELEN *et al.*, 2002). A perda da capacidade de fixar nitrogênio no mutante de *A. brasilense* pode ser explicada pelo efeito de GlnD sobre GlnB, que na forma GlnB-UMP é necessária para a atividade de NifA, a ativadora de transcrição dos genes *nif* (ARSÈNE *et al.*, 1996). O mutante *glnD* de *A. brasilense* não apresentou auxotrofia a glutamina, porém em *K. pneumoniae* a atividade de GS foi afetada em condições limitantes de nitrogênio (20% em relação à da estirpe selvagem) (EDWARDS e MERRICK, 1995; van DOMMELEN *et al.*, 2002).

Em *A. vinelandii*, uma inserção *Tn5* localizada na extremidade 3' do gene *glnD* produziu estirpes com características Ntr<sup>+</sup> e Nif. A GS não apresentou alterações, sendo adenilada de forma reversível em resposta a variação de amônio intracelular (CONTRERAS *et al.*, 1991). Como o sistema de dois componentes NtrC-NtrB em *A. vinelandii* é semelhante ao de *E. coli*, foi sugerido que outras quinases poderiam estar atuando na fosforilação de NtrC mascarando o fenótipo Ntr<sup>-</sup>. Nesse mutante *glnD*, a supressão do fenótipo Nif foi obtida com uma mutação em *nifL*. Isto se deve provavelmente pela inativação de NifL por GlnB-UMP em condições limitantes de nitrogênio (CONTRERAS *et al.*, 1991). Colnaghi *et al.*, (2001) propuseram que a proteína GlnD truncada desses mutantes *glnD* (com mutações muito próximas da porção C-terminal) poderia estar retendo as atividades associadas à GS e NtrC, o que não ocorreu em relação a regulação de NifL/NifA.

Nas espécies do gênero *Rhizobium* (*Rhizobium tropici* e *Rhizobium leguminosarum*), os promotores dependentes de NtrC-P são inativos nos mutantes *glnD* (inserção *Tn5*), causando a perda da capacidade de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio (O'CONNELL *et al.*, 1998; SCHÜLTER *et al.*, 2000). Todavia, em ambas espécies, a fixação de nitrogênio e a atividade de GS não sofreram alterações com a mutação do gene *glnD* (O'CONNELL *et al.*, 1998; SCHÜLTER *et al.*, 2000).

Na bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* a inserção de *Tn5* na extremidade 3' do gene *glnD* causou inativação de GS com um efeito pleiotrópico na utilização de fontes alternativas de nitrogênio (Ntr<sup>-</sup>) (PERLOVA *et al.*, 2002). Embora o gene *glnD* nesta estirpe mutante não seja necessário para a expressão da nitrogenase, a região 3' foi necessária para a inibição reversível da atividade nitrogenase (*switch-off*) (PERLOVA *et al.*, 2002).

Em *H. seropedicae*, mutantes *glnD* obtidos por recombinação homóloga foram incapazes de fixar nitrogênio e de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio (SANSON *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que todas essas mutações foram realizadas na extremidade 3' do gene *glnD*. Tentativas de anular o gene *glnD* por inserção ou deleção da porção central e/ou N-terminal foram letais em vários organismos (*A. vinelandii*, *R. leguminosarum*, *K. pneumoniae*, *G. diazotrophicus*). Em *A. vinelandii* uma mutação nula do gene *glnD* (perda da função do gene) só poderia ser mantida se houvesse uma segunda mutação impedisse a adenililação da GS (COLNAGHI *et al.*, 2001). Em *Sinorhizobium meliloti* mutantes *glnD* não puderam ser isolados. A mortalidade nesse caso pode estar relacionada com um efeito polar sobre outros genes essenciais, uma vez que mesmo mutações adicionais que preveniam a adenililação de GS não foram suficientes para tornar as células viáveis (RUDNICK *et al.*, 2001).

Portanto *glnD* é uma proteína essencial na maioria dos organismos e a manutenção de mutações principalmente na extremidade 5' requer a presença de outra mutação supressora induzida ou espontânea.

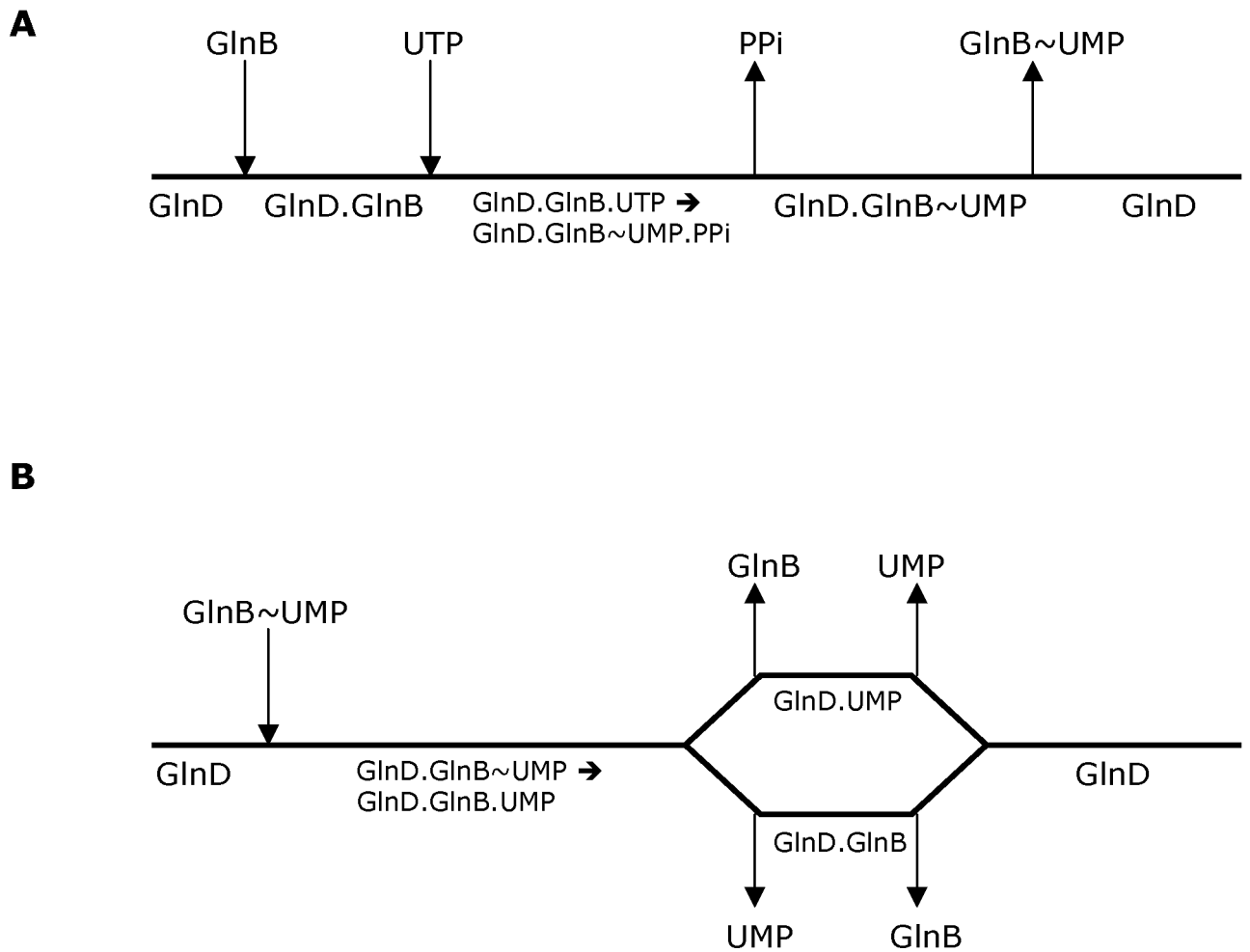
### 1.8.3 Mecanismo Cinético da Proteína GlnD

A análise cinética da reação de uridililação e de diferentes padrões de inibição mostrou que esta reação ocorre via um mecanismo ordenado no qual GlnB se liga a GlnD e, em seguida, à UTP. O PPI é o primeiro produto liberado seguido por GlnB-UMP (JIANG *et al.*, 1998c) (FIGURA 4A). Na reação de desuridililação a ligação de GlnD ao substrato (GlnB-UMP) é rápida e os produtos são liberados de forma aleatória (FIGURA 4B).

A atividade de uridililtransferase de GlnD requer 2-oxoglutarato e ATP, sendo inibida por glutamina (FRANCIS e ENGLEMAN, 1978). A ativação da uridililtransferase por 2-oxoglutarato e ATP ocorre de forma indireta pela alteração conformacional da proteína GlnB (KAMBEROV *et al.*, 1995). Em condições fisiológicas, as atividades da proteína GlnD são controladas por glutamina (JIANG *et al.*, 1998c).

Estudos *in vitro* mostraram que a especificidade por nucleotídeos não é restrita a UTP, sendo que a transferência covalente de AMP, CMP ou GMP, a partir dos respectivos nucleotídeos trifosfato, pode ocorrer. Porém, a proteína GlnD tem maior afinidade por UTP como substrato, pois quando outros nucleotídeos estão presentes em concentrações fisiológicas, GlnB-UMP constitui 94% da proteína GlnB modificada (JIANG *et al.*, 1998c).

**FIGURA 4.** ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO CINÉTICO DAS REAÇÕES DE ADIÇÃO E REMOÇÃO DE UMP DA PROTEÍNA PII CATALIZADO PELA PROTEÍNA GlnD



Mecanismo cinético do tipo ordenado para a reação de uridililação (A) e do tipo aleatório para desuridililação de GlnB. O sinal “~” indica ligação covalente. Adaptado do esquema de Jiang *et al.* (1998c).

#### 1.8.4 Domínios Conservados da Proteína GlnD

O termo 'domínio conservado' designa motivos geralmente funcionais que se repetem numa mesma proteína ou em proteínas diferentes. A proteína GlnD possui 3 domínios conservados (FIGURA 5).

##### 1.8.4.1 Domínio Nucleotidiltransferase

As nucleotidiltransferases estão envolvidas em vários processos biológicos importantes no qual ocorre a transferência de um nucleotídeo a um grupo receptor hidroxila de outra molécula. As nucleotidiltransferases catalisam reações essenciais como: (i) replicação e reparo: DNA polimerases, primases e ligases; (ii) transcrição: RNA polimerases DNA-dependentes; (iii) processamento de RNA: poli-A polimerases; e (iv) replicação viral: RNA polimerases RNA-dependente e transcritases reversas (ARAVIND e KOONIN, 1999a). Além desses processos fundamentais, as nucleotidiltransferases também podem participar de vias mais especializadas, tal como a de transdução de sinais (PLAYER e TORRENCE, 1998).

De acordo com a homologia na seqüência de seus aminoácidos essas enzimas estão distribuídas em diferentes famílias. Aravind e Koonin (1999a) identificaram uma nova família dentro da superfamília pol- $\beta$  nucleotidiltransferase utilizando o programa PSI-BLAST (*position-sensitive iterative database search*). Esta família é constituída pelas proteínas GlnE e GlnD, que catalisam a transferência ou remoção de nucleotídeos em proteínas da via de transdução de sinais. As proteínas pertencentes à superfamília pol- $\beta$  podem estar relacionadas a processos distintos, porém são caracterizadas por uma seqüência de resíduos de aminoácidos padrão hG[GS]x(9,13)Dh[DE]h (onde "x" indica um aminoácido qualquer e "h" um aminoácido hidrofóbico).

#### 1.8.4.2 Domínio HD

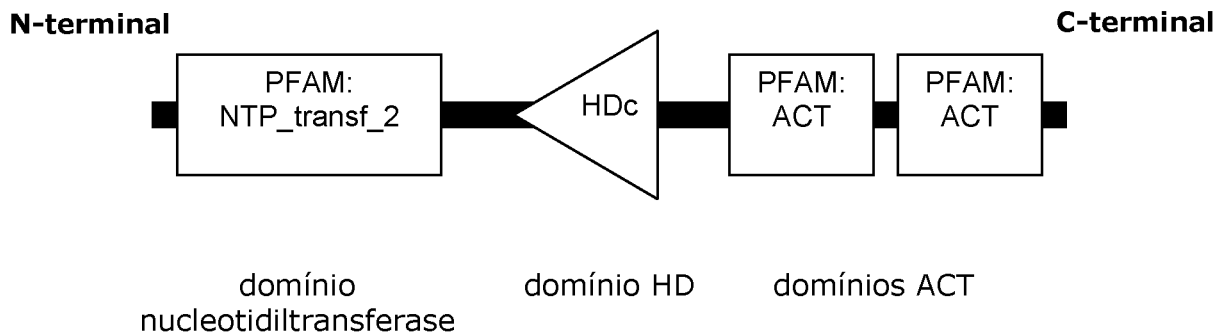
O domínio HD define uma superfamília de enzimas com atividade fosfolidrolase envolvidas no metabolismo dos ácidos nucleicos e na transdução de sinais (ARAVIND e KOONIN, 1998). A identificação desse domínio é dificultada por ser um domínio acessório com baixo nível de conservação.

A maior característica no domínio HD é a presença de resíduos quelantes de metais, usualmente histidina (H) ou aspartato (D) (origem de sua denominação) (ARAVIND e KOONIN, 1998). As ligações coordenadas com cátions divalentes que podem ocorrer com esses resíduos sugere que a presença de metais divalentes seja essencial para a atividade dessas proteínas. Dados experimentais com dGTPases e outras hidrolases indicam que seus substratos são uma ampla variedade de moléculas que possuem ligações fosfodiéster (HUBER *et al.*, 1998).

#### 1.8.4.3 Domínio ACT

O domínio ACT corresponde a um domínio regulatório de ligação a uma molécula ligante, na maioria das vezes aminoácidos (ARAVIND e KOONIN, 1999b). Esse domínio pode estar presente em proteínas com funções diversas como aquelas envolvidas na regulação do metabolismo geral bacteriano, e, no caso da proteína GlnD, esse domínio é responsável pela ligação a glutamina (ARAVIND e KOONIN, 1999b). Em *E. coli*, na interface da proteína 3-fosfoglicerato desidrogenase, um par de domínios ACT formam 8 fitas  $\beta$ -pregueada anti-paralelas que interagem com 2 moléculas de serina, o inibidor alostérico dessa proteína (SCHÜLLER *et al.*, 1995).

FIGURA 5. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA GlnD



#### 1.8.5 Outras Funções Relacionadas à Proteína GlnD

Muitas bactérias podem produzir o poli-3-hidroxi-butirato (PHB) como forma de armazenamento de carbono em situações adversas (ANDERSON e DAWES, 1990). Algumas espécies do gênero *Azospirillum* podem acumular altos níveis de PHB sob condições de estresse nutricional ou alta taxa de carbono/nitrogênio. Porém, especificamente durante a fase exponencial de crescimento a estirpe selvagem de *Azospirillum brasilense* produz baixas quantidades de PHB (TAL e OKONY, 1985). Nos duplos mutantes *glnB glnZ* deste organismo foi verificado que a produção de PHB é aumentada durante essa fase, enquanto que no mutante *glnD*, o acúmulo de PHB é ainda maior podendo chegar a mais de 40% do peso seco celular (SUN *et al.*, 2002). Isto indica o envolvimento de GlnD na regulação da biossíntese de PHB por íons amônio através de uma via independente de GlnB. Este efeito pode ser indireto, já que os mutantes *nif* também acumulam PHB (SUN *et al.*, 2002).

Muitos organismos, quando crescidos em condições deficientes de ferro, são capazes de sintetizar e utilizar queladores de ferro denominados sideróforos. Os sideróforos são utilizados para seqüestrar e solubilizar íons de ferro ( $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$ ) que circundam o meio externo. Mutantes *glnD* da bactéria *Vibrio fischeri*, além de serem menos eficientes na utilização de  $N_2$  em relação à estirpe selvagem, possuem menor capacidade de sintetizar sideróforos, de crescer em condições limitantes de ferro e de colonizar o organismo hospedeiro (GRAF e RUBY, 2000). Portanto, nesse



organismo parece haver uma relação entre o sensoriamento de amônio, síntese de sideróforo e capacidade simbiótica.

### 1.9 A PROTEÍNA GlnB

A proteína GlnB é uma proteína transdutora de sinais altamente conservada encontrada em praticamente todos os grupos de procariotos, além de estar presente em plantas superiores, como no caso da *Arabidopsis thaliana* (HSIEH *et al.*, 1998).

A proteína GlnB de *E. coli* é um trímero com subunidades idênticas que possuem massa molecular de 12.435 Da (de MEL *et al.*, 1994; VASUDEVAN *et al.*, 1994). Sua expressão em *E. coli* a partir do gene *glnB* é constitutiva (LIU e MAGASANIK, 1993). A observação de uma reação cruzada entre uma proteína presente no extrato celular de uma estirpe de *E. coli* *glnB*<sup>-</sup> e anticorpos anti-GlnB num experimento de *western blot* sugeriu a presença de uma proteína homóloga a GlnB (van HEESWIJK *et al.*, 1995). Esse fato foi confirmado com outra estirpe de *E. coli* *glnB*<sup>-</sup> que tinha a GS adenililada na mesma extensão que a GS na estirpe selvagem quando crescida em baixos níveis de amônio (van HEESWIJK *et al.*, 1996). Em *E. coli*, a proteína homóloga a GlnB foi denominada GlnK. Em *E. coli* o gene *glnK* está associado ao gene *amtB*, que codifica para a proteína transportadora de amônio AmtB, constituindo o operon *glnKamtB* (van HEESWIJK *et al.*, 1996). A formação de heterodímeros GlnB-GlnK *in vivo* foi verificada em *E. coli* crescida em baixos níveis de amônio (FORCHHAMMER *et al.*, 1999). Possivelmente esses heterodímeros facilitam o ajuste fino da cascata do sistema Ntr (van HEESWIJK *et al.*, 2000).

A principal função das proteínas GlnB é atuar na transdução de sinais moleculares. Essa capacidade é conferida pela sua interconversão entre as formas uridililada (GlnB-UMP) e não-uridililada (GlnB) (BROWN *et al.*, 1971). A uridililação ocorre no resíduo altamente conservado de tirosina situado na posição 51 da volta "T" (SON e RHEE, 1987; JAGGI *et al.*, 1996), mas outros resíduos de aminoácidos presentes nessa mesma região também são importantes. A substituição Tyr46Phe faz com que GlnB seja uridililada numa taxa bem menor que na estirpe selvagem de

*E. coli* (JAGGI *et al.*, 1996). Duas mutações, Gly41Ala e Ala49Pro, eliminam totalmente a interação de GlnB com GlnD ou NtrB (JIANG *et al.*, 1997).

#### 1.9.1 Efeito de Moléculas Efetoras na Proteína GlnB

A proteína GlnB trimérica possui 3 sítios de ligação para 2-oxoglutarato (JIANG *et al.*, 1998a). A ligação de 2-oxoglutarato induz a modificação da conformação de GlnB e sua interação com outras proteínas (JIANG *et al.*, 1998a). A ligação de uma molécula de 2-oxoglutarato inibe a ligação de outras moléculas adicionais desse efetor nos 2 sítios remanescentes. GlnB associada a 1 molécula de 2-oxoglutarato interage com maior afinidade com NtrB e GlnE (JIANG *et al.*, 1998c; KAMBEROV *et al.*, 1995). Porém, quando o nível de 2-oxoglutarato está alto, os outros 2 sítios de ligação restantes de GlnB são ocupados pelo modulador fazendo com que GlnB assumira uma conformação que desfavoreça sua interação com NtrB e GlnE. No entanto, essa condição favorece a interação GlnB-GlnD, de tal forma que GlnB pode ser uridililada por GlnD (JIANG *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1998b; JIANG *et al.*, 1998c).

Além de poder ligar 2-oxoglutarato, GlnB possui um sítio de ligação ao ATP que se apresenta bem conservado em todas as proteínas homólogas a GlnB. A ligação de ATP a GlnB é necessária para GlnB se ligar a GlnD (JIANG *et al.*, 1998c). Como o ATP e o 2-oxoglutarato se ligam a GlnB com cooperatividade positiva, foi sugerido que os níveis de carbono e energia refletiriam um único sinal na célula (XU *et al.*, 1998).

#### 1.9.2 Proteína GlnB de *H. seropedicae*

O gene *glnB* de *H. seropedicae* é expresso de forma constitutiva a partir de um promotor do tipo  $\sigma^{70}$  e codifica para um polipeptídeo com massa molecular de 12,3 KDa (BENELLI *et al.*, 1997).

Estudos com estirpes *glnB<sup>-</sup>* de *H. seropedicae* indicaram a presença de 2 genes que codificam para proteínas homólogas a GlnB (BENELLI *et al.*, 1997). A

proteína GlnB nesse organismo está envolvida no sensoriamento dos níveis de nitrogênio e no controle da atividade de NifA (BENELLI *et al.*, 2002b). O controle da atividade da GS não é dependente de GlnB. A estirpe mutante *glnB*<sup>-</sup> apresentou fenótipo Nif<sup>-</sup>, demonstrando que a sinalização dos níveis de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para a proteína NifA não envolve a proteína paróloga a GlnB (BENELLI *et al.*, 1997). Em *H. seropedicae*, esta proteína paróloga é codificada pelo gene *glnK* que se encontra, como em *E. coli*, a montante do gene *amtB* (NOINDORF, 2002).

A proteína GlnB de *H. seropedicae* teve sua estrutura tridimensional determinada a 2,1 Å (BENELLI *et al.*, 2002a). Com base na sua estrutura cristalográfica foram propostos na cavidade lateral sítios de ligação para ATP e 2-oxoglutarato. A porção C-terminal possui estrutura semelhante a aquelas das proteínas GlnK nativa de *E. coli* e GlnK e GlnB de *E. coli* ligadas ao ATP (BENELLI *et al.*, 2002a).

#### 1.9.2.1 Uridililação da Proteína GlnB de *H. seropedicae*

A uridililação da proteína GlnB de *H. seropedicae* com o extrato livre de células ou com a GlnD parcialmente purificada de *E. coli* foi estimulada em baixas condições de amônio e requer a presença de ATP ou 2-oxoglutarato. Quando o ATP e o 2-oxoglutarato estão presentes na reação foram verificados os maiores níveis de uridililação (BENELLI *et al.*, 2001). A desuridilação de GlnB-UMP em presença do íon Mn<sup>2+</sup> foi dependente de glutamina tanto no extrato livre de células quanto com GlnD purificada de *E. coli*. A adição de ATP ou 2-oxoglutarato não inibiram a reação de remoção de UMP, ao contrário do que ocorre quando ambos estão presentes (BENELLI *et al.*, 2001).

## 2. OBJETIVOS

Os estudos envolvendo o mecanismo de sinalização do sistema Ntr foram limitados durante um longo tempo principalmente pela dificuldade encontrada na época em purificar a proteína GlnD numa forma homogênea ativa. Para investigar a função da proteína GlnD de *H. seropedicae in vitro*, é necessário obter uma fração homogênea desta proteína. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- Clonar o gene *glnD* de *H. seropedicae*
- Expressar e purificar a proteína GlnD de *H. seropedicae*

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados nos experimentos estão descritos na TABELA 2.

TABELA 2. ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS UTILIZADOS

| Estirpes                     | Genótipo / fenótipo  | Referência                    |
|------------------------------|--|-------------------------------|
| <b><i>H. seropedicae</i></b> |  |                               |
| SMR1                         | selvagem, Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup>   | SOUZA <i>et al.</i> , 2000    |
| <b><i>E. coli</i></b>        |  |                               |
| DH10B                        | Sm <sup>R</sup> , F'[ <i>proAB+lacZΔM15</i> ]  | SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989 |
| BL21(λDE3) <i>pLysS</i>      | <i>hsdS gal (λclts 875 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i> (produz RNA polimerase do fago T7)  | SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989 |
| RB9065(λDE3)                 | <i>glnB2306, glnD99::Tn10, Tc<sup>R</sup></i> (produz RNA polimerase do fago T7)   | BENELLI <i>et al.</i> , 2001  |
| Plasmídeos                   |  |                               |
| pGEM-T                       | Amp <sup>R</sup> , vetor de clonagem e expressão de produtos PCR, possui promotores do fago T7 e SP6 e apresenta um resíduo de timina protuberante nas extremidades 3' | Promega                       |
| pET28b(+)                    | Km <sup>R</sup> , vetor de expressão com o promotor do fago T7 que gera proteína fusionada a uma cauda His <sub>6</sub> na porção N-terminal                           | Novagen                       |
| pET29a(+)                    | Km <sup>R</sup> , vetor de expressão com o promotor do fago T7   | Novagen                       |
| pGH                          | vetor pGEM-T com o gene <i>glnD</i> de <i>H. seropedicae</i>   | Este trabalho                 |
| pGH1                         | vetor pET28a expressando a proteína GlnD de <i>H. seropedicae</i> fusionada a uma cauda de histidina   | Este trabalho                 |
| pGH2                         | vetor pET29a expressando a proteína GlnD de <i>H. seropedicae</i> na forma nativa  | Este trabalho                 |

## 3.2 MEIOS DE CULTIVO

A estirpe SMR1 de *H. seropedicae* foi cultivada em meio líquido NFbHPN (KLASSEN *et al.*, 1995) contendo malato como fonte de carbono (NFbHP-malato) e um pH final de 6,0. A composição do meio é a seguinte:

|   | gramas/litro          |
|---|-----------------------|
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 0,2                   |
| NaCl  | 0,1                   |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 0,2                   |
| Ácido nitrilo-triacético                            | 5,6.10 <sup>-2</sup>  |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 0,02                  |
| biotina   | 1.10 <sup>-4</sup>    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 2.10 <sup>-3</sup>    |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 2,35.10 <sup>-3</sup> |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 2,8.10 <sup>-3</sup>  |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 8.10 <sup>-5</sup>    |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 2,4.10 <sup>-4</sup>  |
| malato de sódio                                     | 5,0                   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 4,0                   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 6,0                   |

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH<sub>4</sub>Cl (20 mmol/L de concentração final). As soluções de fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e de NH<sub>4</sub>Cl foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio frio no momento de uso.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas no meio LB (Luria-Broth) esterilizado com o pH 7,0 e a seguinte composição (SAMBROOK *et al.*, 1989):

|                     | gramas/litro |
|---------------------|--------------|
| extrato de levedura | 5,0          |
| NaCl                | 10,0         |
| triptona            | 10,0         |

Para o preparo do meio LA (Luria-ágar) foi adicionado 1,5% (m/v) de ágar no meio LB.

### 3.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados e suas respectivas concentrações finais para o cultivo das estirpes de *E. coli* e *H. seropedicae* estão listados na TABELA 3.

**TABELA 3 - ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES FINAIS**

| Antibiótico    | Abreviação | Concentração final (µg/mL) |
|----------------|------------|----------------------------|
| canamicina     | Km         | 50                         |
| estreptomicina | Sm         | 20                         |
| tetraciclina   | Tc         | 20                         |
| ampicilina     | Amp        | 250                        |

### 3.4 MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos foram mantidos em glicerol 50% a -20°C e/ou em meio sólido LA (adição de 15 g/L de ágar no meio LB) a 4°C.

### 3.5 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Para a análise das seqüências nucleotídicas obtidas a partir do DNA genômico do *H. seropedicae* foram utilizados os programas Frameplot (<http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>) e Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). A identificação e anotação dos domínios na seqüência de aminoácidos da proteína GlnD de *H. seropedicae* foram realizadas utilizando os programas CDD-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) e PFAM (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). O programa Clustal W (1.82) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) foi utilizado para fazer o alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína GlnD do *H. seropedicae* com os diversos organismos.

### 3.6 MANIPULAÇÃO DE DNA

#### 3.6.1 Purificação de DNA Cromossomal de *H. seropedicae*

Dez mililitros de cultura de *H. seropedicae* foram crescidos durante a noite em meio NFbHPN malato suplementado com 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl. Depois de centrifugado durante 3 minutos em tubos eppendorf de 1,5 mL, o precipitado celular foi ressuspensão em 7,5 mL de tampão TES (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, EDTA 20 mmol/L, NaCl 100 mmol/L). Foram adicionadas as células 100 µg/mL de lisozima que foram mantidas em repouso a 37°C durante 15 minutos.

As células foram lisadas pela adição de 0,9 mL de uma solução contendo SDS a 10% (m/v) (concentração final de 1%) após incubação durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, proteinase K (concentração final de 200 µg/mL)



foi adicionada ao lisado celular que foi incubado a 37°C durante a noite. Na manhã seguinte, a mistura foi desproteinizada com sucessivas extrações com 1 volume da solução fenol:clorofórmio:álcool isoalímico (25:24:1) até não se observar a formação de precipitado na interface das 2 soluções. A solução aquosa foi extraída com 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguida de precipitação do DNA cromossômico com 2 volumes de etanol 95% seguido de incubação em gelo durante 30 minutos.

Os tubos foram centrifugados durante 10 minutos, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo, ressuspenso em 100 µL de H<sub>2</sub>O mili-Q estéril contendo 100 µg/mL de RNase e mantido em repouso até a solubilização completa do DNA. A pureza do DNA foi determinada pela relação 260 e 280 nm e sua concentração estimada através da leitura da D.O. a 260nm.

### 3.6.2 Purificação de DNA Plasmidial

A purificação de plasmídeos de *E. coli* foi realizada de acordo com o método de lise alcalina descrita por Sambrook *et al.* (1989) com algumas modificações. Cinco mililitros de cultura de *E. coli* com o plasmídeo de interesse foram crescidos durante a noite em meio LB com o antibiótico marcador do plasmídeo na concentração recomendada. Na manhã seguinte, as células foram centrifugadas durante 3 minutos em tubos eppendorf de 1,5 mL e 150 µL da solução de GET (glucose 50 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0 e EDTA 10 mmol/L pH 8,0) foram adicionados ao precipitado de células (observação: para a purificação do plasmídeo pGH para a reação de seqüenciamento (item 3.8), nesta etapa foi adicionado RNase 2 µg/mL). Após 10 minutos no gelo, as células foram lisadas por 5 minutos a temperatura ambiente com a adição de 150 µL de uma solução contendo SDS 1% (m/v) e NaOH 0,2 mol/L. Proteínas, DNA cromossomal e restos celulares foram precipitados com a adição de 150 µL de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e incubação durante 10 minutos em gelo. Depois desse período, os tubos foram centrifugados durante 10 minutos e a solução sobrenadante foi passada para outro tubo seguida da adição de fenol:clorofórmio:álcool isoalímico (25:24:1). A solução difásica foi homogeneizada em vortéx, centrifugada por 10 minutos e a fração

aquosa foi separada em outro tubo. Neste, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto seguido de incubação no gelo durante 30 minutos e centrifugação por 5 minutos. O DNA plasmidial precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 30 µL de H<sub>2</sub>O mili-Q autoclavada. Os plasmídeos foram separados por eletroforese em gel de ágar 1% (m/v) e visualizados sob iluminação UV após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

### 3.6.3 Digestão do DNA com Enzimas de Restrição

Para a digestão de 0,1 – 1 µg de DNA foram utilizadas de uma a cinco unidades de diferentes enzimas de restrição num volume de 20 µL nas condições especificadas pelo fabricante (temperatura ótima de atividade da enzima, forma de inativação da enzima, adição ou não de BSA).

### 3.6.4 Preparo dos Vetores de Expressão

Os vetores de expressão pET28b(+) e pET29a(+) foram submetidos a clivagem com as enzimas de restrição *Nde*I e *Bam*HI (New England BioLabs) durante a noite. Após a digestão, as enzimas de restrição foram desnaturadas pelo calor e o DNA foi precipitado com etanol absoluto seguido de 2 lavagens com etanol 80%. O DNA foi seco a vácuo e dissolvido em 30 µL de H<sub>2</sub>O mili-Q autoclavada.

### 3.6.5 Clonagem do Gene *glnD* de *H. seropedicae* nos Vetores de Expressão

Para a clonagem do gene *glnD* foi utilizado o vetor pGEM-T, que permite sua ligação direta (“clonagem TA”) com os fragmentos gerados após amplificação por PCR. O sistema de ligação pGEM-T e inserto continha 0,3 µL (15 ng) do vetor pGEM-T linearizado, 5 µL (100 ng) do produto de amplificação, tampão de ligação 1x (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L, ATP 0,5 mmol/L, e PEG 8000 5%) e 1U de T4 DNA ligase num volume final de 15 µL. Antes da adição

do tampão de ligação e da enzima no sistema, a mistura vetor-inserto foi aquecida a 65°C durante 5 minutos e resfriada em gelo. O sistema de ligação foi incubado durante a noite a 16°C.

Para a ligação do inserto nos vetores de expressão pET28b(+) e pET29a(+), o plasmídeo recombinante pGH (vetor pGEM-T com o gene *glnD* de *H. seropedicae*) foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e o inserto resultante foi purificado do gel de ágarose de baixo ponto de fusão (*Low melting point*) e dissolvido em 8 µL de H<sub>2</sub>O mili-Q autoclavada. Os plasmídeos pET28b(+) e pET29a(+) foram preparados conforme descrito no item 3.6.4. O sistema de ligação continha 8 µL (30 ng) do inserto, 0,5 µL (10 ng) de pET28b(+) ou pET29a(+), tampão de ligação 1x e 1U de T4 DNA ligase num volume final de 15 µL. Antes da adição do tampão de ligação e da enzima, a mistura vetor-inserto foi aquecida a 65°C durante 5 minutos e resfriada em gelo. O sistema de ligação foi incubado durante a noite a 16°C.

### 3.6.6 Análise dos Plasmídeos Recombinantes

Para a análise dos possíveis clones foi elaborado um protocolo de isolamento de DNA plasmidial no qual é possível analisar rapidamente um grande número de colônias sem a necessidade de digestão com enzimas de restrição. Neste caso, a presença do inserto no vetor é identificada pela migração mais lenta, no gel de ágar, do plasmídeo recombinante em relação ao plasmídeo sem inserto (controle negativo).

Cada colônia transformante foi inoculada em 1 mL de meio LB distribuído em um bloco de 96 poços (capacidade de 2 mL em cada poço). As células foram crescidas a 37°C durante a noite, centrifugadas durante 5 minutos a 3.700 rpm, e 50 µL de GET (glucose 50 mmol/L, Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0 e EDTA 10 mmol/L pH 8,0) foram adicionados em cada poço. Após homogeneização em vórtex, a cada poço foi adicionado 20 µL da solução fenol:clorofórmio:álcool isoalímico (25:24:1) e 20 µL de Fsuds (ficol 25%, SDS 0,5%, EDTA 1mmol/L pH 8,0, Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0, azul de bromofenol e xileno cianol) seguido de homogeneização em vórtex. O bloco foi centrifugado durante 10 minutos a 3.700 rpm e 15 – 20 µL da solução

sobrenadante foram aplicados em gel de ágar 1% (m/v) em tampão TAE 1x. O perfil eletroforético foi visualizado após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Após uma análise inicial em gel de ágar, os prováveis clones foram selecionados e analisados para a presença do gene *glnD* através da digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*.

### 3.7 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *glnD* DE *H. seropedicae*

O gene *glnD* de *H. seropedicae* foi localizado com auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o Banco de Dados GENOPAR. Para amplificação do gene *glnD* (2553 pb) de *H. seropedicae* foram construídos oligonucleotídeos iniciadores específicos *HsglnDFoward* (5'-ATTCCACATATGCCACTCT-3') e *HsglnDReverse* (5'-GGCGAGGATCCGATTGTACG-3') (Invitrogen) aos quais foram introduzidos os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI*, respectivamente (bases sublinhadas). A seqüência correspondendo a totalidade do gene *glnD* foi amplificada a partir do DNA genômico de *H. seropedicae* no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). O sistema da reação continha: DNA cromossomal 10 ng, dNTP 0,2 mmol/L (mistura de 0,2 µmol/L de cada desoxiribonucleotídeo), oligonucleotídeos iniciadores 10 pmol de cada, solução tampão (Tris-HCl 10 mmol/L pH 9,0 e KCl 50 mmol/L ) diluída 10 vezes, 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> e 1U de Taq DNA polimerase num volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos seguido de 25 ciclos consecutivos que consistiam de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento durante 40 segundos a 50°C e alongamento a 72°C durante 3 minutos e, por fim, um ciclo final de alongamento a 72°C durante 10 minutos e estoque a 4°C. O tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação foram monitorados em gel ágar 1% após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/ml) sob iluminação UV.

### 3.8 SEQÜENCIAMENTO DO GENE *glnD* DE *H. seropedicae*

Após a purificação (item 3.6.2), o plasmídeo pGH (pGEM-T contendo o gene *glnD* de *H. seropedicae*) foi preparado para o seqüenciamento utilizando o kit de inserção EZ::TN™ (Epicentre). Este kit utiliza a técnica de inserção aleatória *in vitro* de um transposon que carrega consigo um marcador de resistência a canamicina e um sítio de ligação de oligonucleotídeos para a reação de seqüenciamento. As colônias que tiveram o marcador inserido no gene *glnD* foram selecionadas por análise de restrição e seus plasmídeos foram preparados para a reação de seqüenciamento.

O sistema da reação de seqüenciamento (8 µL) continha os seguintes componentes: 200 ng do plasmídeo purificado, 10 pmol de oligonucleotídeo iniciador Reverso ou Universal e 4 µL de DYEnamic ET Terminator (Amersham Bioscience). A reação foi realizada no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) com 34 ciclos consecutivos de 20 segundos a 96°C e 1 minuto e 30 segundos a 60°C. O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado a frio com adição de 32 µL de H<sub>2</sub>O e 60 µL de isopropanol seguido de centrifugação durante 30 minutos. Após seco a vácuo, o DNA foi dissolvido em 4 µL de tampão formamida, desnaturado (96°C por 2 minutos) e submetido à eletroforese no seqüenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

### 3.9 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

#### 3.9.1 Preparo de Bactérias *E. coli* Eletrocompetentes

Quinhentos mililitros de meio líquido LB foram inoculados com 5 mL de uma cultura de *E. coli* DH10B, BL21(λDE3)*pLysS* ou RB9065(λDE3) crescida durante 12 horas. A cultura foi incubada sob agitação constante a 37°C até atingir uma D.O.<sub>600</sub> 0,5. Após atingir essa D.O., a cultura foi mantida em gelo durante 20 minutos e centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos. As células foram lavadas com 500 mL (1 vez) e 250 mL (2 vezes) de H<sub>2</sub>O mili-Q estéril gelada para garantir a

eliminação de sais e 10 mL de glicerol 10%. As alíquotas (30 µL) foram mantidas a temperatura de -70°C.

### 3.9.2 Transformação Bacteriana

Para transformação bacteriana, 1 µL (200 µg) da amostra de DNA plasmidial previamente preparada (item 3.6.2) foi adicionado a 30 µL da suspensão de células eletrocompetentes a frio. Estas foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BRL) e submetidas a uma corrente elétrica (4 KΩ, 330 µF) para a entrada do plasmídeo na célula. As células foram retiradas da cubeta, transferidas para um frasco contendo 1 mL de meio LB e incubadas em agitador a 37°C durante 30 minutos. Após esse período, alíquotas de 100 µL da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo o antibiótico correspondente à resistência do plasmídeo de interesse a fim de selecionar os transformantes.

### 3.10 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de ágar 1% (m/v) com tampão TAE 1x (Tris-acetato 40 mmol/L pH 8,0 e EDTA 1mmol/L pH 8,0). A visualização do perfil eletroforético deu-se após coloração do gel com brometo de etídio (5 µg/mL) utilizando um trans-iluminador acoplado a um sistema de vídeo (UVP Bioimaging Systems) e um computador. O programa de aquisição e análise de imagens da LabWorks foi utilizado para a análise dos géis.

### 3.11 SUPEREXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnD E GlnD-HIS DE *H. seropedicae*

#### 3.11.1 Verificação dos Diferentes Parâmetros que Influenciam o Nível de Expressão e o Grau de Solubilidade das Proteínas GlnD e GlnD-His de *H. seropedicae*

Os plasmídeos pGH1 (plasmídeo que expressa GlnD-His) e pGH2 (plasmídeo que expressa GlnD nativa) foram introduzidos na estirpe de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) ou BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* por eletroporação e as colônias transformantes foram mantidas em meio sólido LA com canamicina (50  $\mu$ g/mL) a 4°C ou em glicerol 50% a -20°C. Para a análise e determinação dos parâmetros que influenciavam a solubilidade e expressão da proteína GlnD, as condições de expressão e a composição do tampão de lise foram variadas de acordo com as que estão apresentadas nos Resultados e Discussão. A TABELA 4 mostra a composição dos tampões testados para a análise da solubilização e para a purificação da proteína GlnD.

Três mililitros de meio LB (20% do volume total do frasco) contendo canamicina (50  $\mu$ g/mL) foram inoculados com três colônias transformantes de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* ou RB9065( $\lambda$ DE3) seguido de incubação durante a noite em agitador sob temperatura constante. Cinqüenta microlitros da cultura foram reinoculados em 5 mL do mesmo meio e após 1 hora (RB9065( $\lambda$ DE3)) e 2 horas (BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS*) as células foram induzidas durante 4,5 horas com IPTG 0,4 mmol/L. Cinco mililitros da cultura foram centrifugados por 3 minutos a 10.000 rpm em tubos (100 mL) de centrifugação. As células foram ressuspendidas em 3 mL de tampão de lise e lisadas por sonicação (10 ciclos de 10 segundos com 30 segundos de intervalo) ou pela Prensa de French (3 passagens a 3.000 psi). Após centrifugação durante 10 minutos a 10.000 rpm, as frações totais, solúveis e insolúveis de proteínas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE segundo protocolo descrito por Laemmli (1970).

### 3.11.2 Superexpressão da Proteína GlnD e GlnD-His de *H. seropedicae* para Purificação

Os plasmídeos pGH1 e pGH2 foram introduzidos na estirpe de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) por eletroporação. Três colônias transformantes com pGH1 ou pGH2 foram inoculadas em 2 mL (RB9065( $\lambda$ DE3) com pGH1) ou 10 mL (RB9065( $\lambda$ DE3) com pGH2) de meio LB com 50  $\mu$ g/mL de canamicina seguido de incubação por 12 horas a 30°C sob agitação a 200 rpm. As culturas foram diluídas em 200 mL (pGH1)

e 1 L (pGH2) de meio LB (20% do volume total do frasco) com 50 µg/mL de canamicina e incubadas a 30°C a 120 rpm de agitação. Após 1 hora, IPTG (0,5 mmol/L) foi adicionado para a indução do gene *glnD* e a cultura foi incubada por mais 4,5 horas nas mesmas condições.

### 3.12 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD-His DE *H. seropedicae* POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Após indução, 200 mL da cultura de *E. coli* RB9065(λDE3) com o plasmídeo pGH1 foram centrifugados durante 5 minutos a 10.000 rpm e 4°C. A solução sobrenadante foi descartada e o precipitado celular foi dissolvido em 3 mL de **tampão de lise T500A** (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, glicerol 10%, DTT 1mmol/L) seguindo a proporção de 3 mL de tampão para cada 1 g de células (peso úmido). Após incubação com lisozima (100 µg/mL de concentração final) durante 30 minutos em gelo, as células foram sonicadas com 10 ciclos de 10 segundos com 30 segundos de intervalo entre cada ciclo. As células lisadas foram centrifugadas (10.000 rpm, 20 minutos, 4°C) e a solução sobrenadante foi aplicada em uma coluna HiTrap-Chelating-Ni<sup>2+</sup> de 1 mL previamente preparada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Amersham Biosciences). A coluna foi lavada com 20 volumes (20 mL) de **tampão 1** (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, imidazol 10 mmol/L), 20 volumes de **tampão 2** (Tris-HCl 50 mmol/L pH7,0, NaCl 500 mmol/L, imidazol 50 mmol/L), 20 volumes de **tampão 3** (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, imidazol 100 mmol/L) e 20 volumes de **tampão 4** (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, imidazol 200 mmol/L, DTT 1 mmol/L, glicerol 10%). A eluição da proteína GlnD foi realizada em **tampão 5** (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, imidazol 500 mmol/L, DTT 1 mmol/L, glicerol 10%). Alíquotas de 500 µL foram coletadas em tubos eppendorf e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. As frações mais puras foram armazenadas a 4°C e a – 20°C após a adição de glicerol (50% final).



### 3.13 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE *H. seropedicae* POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Após indução com IPTG durante 4,5 horas, 1 L da cultura de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) com o plasmídeo pGH2 foi centrifugado durante 5 minutos a 10.000 rpm e 4°C. A solução sobrenadante foi descartada e o precipitado celular foi dissolvido em 12 mL de **tampão de lise T200** (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 200 mmol/L, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L). As células foram lisadas por variação de pressão utilizando a Prensa de French (3 passagens a 3.000 psi) previamente resfriada. O lisado celular foi centrifugado durante 20 minutos a 10.000 rpm e 4°C, e a solução sobrenadante foi diluída em 12 mL de **tampão T0** (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L) resfriado para obter uma concentração final de NaCl de 100 mmol/L. Para a purificação da proteína foi utilizada uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose de 30 mL pré-equilibrada com **tampão T100** (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 100 mmol/L, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L) e conectada a um sistema FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*) (Amersham Biosciences) operado a um fluxo de 1 mL/minuto. Vinte e quatro mililitros da preparação protéica foram aplicados na coluna que foi lavada com 1 volume (em relação ao volume da coluna) do tampão T100. A proteína GlnD foi eluída com um gradiente de concentração de NaCl de 100 mmol/L (tampão T100) a 1 mol/L (**tampão T1000**: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 1 mol/L, glicerol 10%, DTT 0,1 mmol/L) num fluxo de 1 mL/minuto. O gradiente utilizando o tampão T1000 foi programado no sistema FPLC a um fluxo de 1 mL/minuto da seguinte maneira: 15 minutos com 30 – 40% de T1000, 25 minutos com 40 – 50% de T1000 e 30 minutos com 50 – 100% de tampão T1000. Outra lavagem somente com tampão T1000 foi realizada durante 5 minutos. As amostras de 5 mL cada foram recolhidas em tubos de ensaio e guardadas a 4°C. As frações foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e agrupadas de acordo com o grau de pureza. As frações de maior pureza foram dialisadas contra 1 L do tampão T200 (modificado para conter 50% de glicerol) durante a noite sob agitação a 4°C e guardadas em pequenas alíquotas (500  $\mu$ L e 100  $\mu$ L) em nitrogênio líquido.

TABELA 4. LISTA DOS TAMPÕES TESTADOS E DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD E GlnD-His DE *H. seropedicae*

| Tampão   | Composição   | Etapa                                 | Referência                    |
|----------|--|---------------------------------------|-------------------------------|
| A200     | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 200 mmol/L, glicerol 10%, DTT 1mmol/L                               | teste solubilidade                    | KAMBEROV <i>et al.</i> , 1994 |
| T500B    | Tris-HCl 50 mmol/L <b>pH 7,5</b> , NaCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L                          | teste solubilidade                    | Este trabalho                 |
| TK500    | <b>Tris-HCl</b> 50 mmol/L pH 7,5, KCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L                            | teste solubilidade                    | Este trabalho                 |
| P500     | <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> 50 mmol/L pH 7,5, NaCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L      | teste solubilidade                    | Este trabalho                 |
| T500A    | Tris-HCl 50 mmol/L <b>pH 7,0</b> , NaCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L                          | purificação na coluna de afinidade    | Este trabalho                 |
| Tampão 1 | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, <b>imidazol 10 mmol/L</b>                              | purificação na coluna de afinidade    | Este trabalho                 |
| Tampão 2 | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, <b>imidazol 50 mmol/L</b>                              | purificação na coluna de afinidade    | Este trabalho                 |
| Tampão 3 | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, <b>imidazol 100 mmol/L</b>                             | purificação na coluna de afinidade    | Este trabalho                 |
| Tampão 4 | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, <b>imidazol 200 mmol/L</b> , DTT 1mmol/L, glicerol 10% | purificação na coluna de afinidade    | Este trabalho                 |
| Tampão 5 | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 500 mmol/L, <b>imidazol 500 mmol/L</b> , DTT 1mmol/L, glicerol 10% | purificação na coluna de afinidade    | Este trabalho                 |
| T200     | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 200 mmol/L, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L                             | purificação na coluna de troca iônica | Este trabalho                 |
| T0       | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L  | purificação na coluna de troca iônica | Este trabalho                 |
| T100     | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 100 mmol/L, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L                             | purificação na coluna de troca iônica | Este trabalho                 |
| T1000    | Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 1M, glicerol 10%, DTT 1 mmol/L                                     | purificação na coluna de troca iônica | Este trabalho                 |

### 3.14 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

Para a análise eletroforética em condições desnaturantes procedeu-se segundo descrito por Laemmli (1970). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 12 mmol/L pH 6,8, glicerol 5%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2mmol/L e azul de bromofenol 0,02%) e desnaturadas a 90°C durante 5 minutos. Alíquotas contendo volumes variados (1-15 µL) foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo SDS. A concentração de poliacrilamida no gel separador e no gel empilhador foi de 10% e 4%, respectivamente. A relação de acrilamida e bis-acrilamida nos 2 géis foi de 29:1. O gel separador continha 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8, 100 µL de SDS 10% (m/v), 50 µL de persulfato de amônio 10% (m/v) e 5 µL de TEMED num volume final de 10 mL. O gel empilhador continha 3 mL de Tris-HCl 0,5 mol/L pH 6,8, 50 µL SDS 10% (m/v), 25 µL de persulfato de amônio 10% (m/v) e 5 µL de TEMED. As eletroforeses foram realizadas numa voltagem de 150 V durante aproximadamente 2 horas em tampão de corrida Tris 25 mmol/L pH 8,3, glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%, utilizando o sistema de mini-géis da Hoefer.

### 3.15 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA como padrão. O sistema de reação foi composto por 1 mL da solução corante (solução de Bradford-Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L, etanol 95% e ácido fosfórico 85%) e 100 µL da amostra. A mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595 nm foi verificada. Uma curva padrão com soro albumina bovina (BSA) foi feita como referência.

### 3.16 ANÁLISE DA HOMOGENEIDADE DA PROTEÍNA GlnD

As proteínas foram coradas pelo método Coomassie Blue Brilliant Colloidal (WESTERMEIER e NAVEN, 2002) e as análises densitométricas foram realizadas utilizando o Personal Densitometer SI (Molecular Dynamics).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

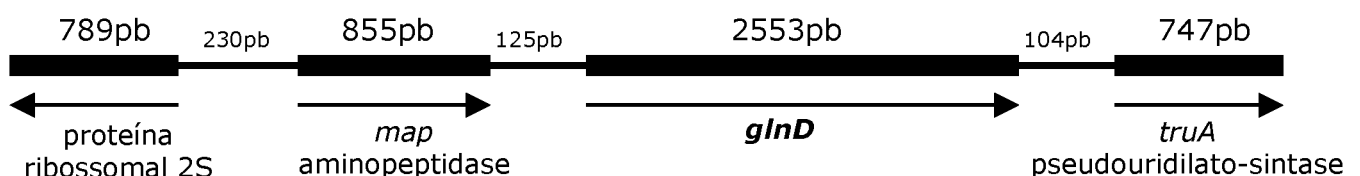
### 4.1 ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae*

Através da comparação de um fragmento de DNA do genoma de *H. seropedicae* com os banco de dados do GenBank, foi encontrada uma ORF (*open reading frame*) de 2553 pb que codifica para uma proteína com alta similaridade com produtos conhecidos do gene *glnD*. Os resultados do programa BLAST mostraram que a seqüência deduzida de aminoácidos possui alta homologia com as proteínas GlnD de *Ralstonia eutropha* (66% de identidade, 77% de similaridade), *Azotobacter vinelandii* (40% de identidade, 58% de similaridade) e *E. coli* (36% de identidade, 54% de similaridade). A proteína GlnD de *H. seropedicae* é formada por 850 resíduos de aminoácidos com massa molecular estimada de 97 kDa e um ponto isoelétrico (pI) calculado de 6,89.

O gene *glnD* está localizado entre duas ORF's, uma com alta homologia com o gene *map*, situado 125 pb a montante, e outra com o gene que codifica para a proteína pseudouridina sintase, situado a 104 pb a jusante do gene *glnD* (FIGURA 6). O gene *map* codifica para uma metionina aminopeptidase, uma enzima responsável pela clivagem do resíduo de metionina N-terminal na etapa de maturação de certas proteínas (RODERICK e MATTHEUS, 1988). A proteína pseudouridina sintase está relacionada com uma família de proteínas responsáveis pela modificação de bases nas moléculas de RNA (tRNA, rRNA e snRNA), através da conversão das bases de uracila em pseudouridina (KAMMEN *et al.*, 1988; WRZESINSKI *et al.*, 1995). Aproximadamente 230 pb a montante de *map* e em direção de transcrição oposta ao do gene *glnD* foi encontrada uma ORF de 789 pb com alta similaridade com o gene *rpsB* que codifica para a proteína ribossomal 2S de *E. coli* (AN *et al.*, 1981). Uma organização similar dos genes *map* e *glnD* é encontrada em *E. coli* (van HEESWIJK *et al.*, 1992). Porém, em *E. coli*, a jusante de *glnD* encontra-se o gene *dapD* responsável pela biossíntese dos aminoácidos diaminopimelato (forma iônica do aminoácido ácido diaminopimélico, um aminoácido encontrado na parede celular das bactérias) e lisina (van HEESWIJK *et al.*, 1992, RICHAUD *et al.*, 1984).

Entre o códon de término (TGA) do gene *map* e o códon de início de tradução (ATG) do gene *glnD*, não foram localizadas prováveis seqüências promotoras similares à seqüência consenso dos promotores dependentes dos fatores  $\sigma^{54}$  e  $\sigma^{70}$ . A montante do gene *map* foram encontradas duas possíveis regiões promotoras  $\sigma^{70}$ : a região **AAGACA –N<sub>16</sub> – TACATT** (situada na posição -236 pb do gene *map*) e a região **AACAGA – N<sub>16</sub> – TATAAT** (a -65 pb do gene *map*), que correspondem nos procariotos a seqüência promotora consenso -35 TTGACA / -10 TATAAT (FIGURA 7). Isto sugere que em *H. seropedicae* o gene *glnD* seja co-transcrito com o gene *map* de maneira constitutiva; e, como em *E. coli* e outros organismos, sua expressão não é regulada por íons amônio. A jusante do códon de terminação (TGA) do gene *glnD* foi localizada uma região palindrômica rica em GC seguida por uma seqüência rica em TA, sugerindo que o término de transcrição ocorra de maneira rho-independente (FIGURA 7) (FARNHAM e PLATT, 1981). A região palindrômica rica em GC faz com que a fita recém-sintetizada de RNA forme um grampo capaz de bloquear a passagem da RNA polimerase, impedindo desta forma a continuidade da transcrição. Sua associação a uma região rica em TA, cuja ligação tipo ponte de hidrogênio é mais fraca em relação à da GC, permite a quebra da fita de RNA recém-sintetizada (FARNHAM e PLATT, 1981).

**FIGURA 6.** MAPA FÍSICO DA REGIÃO DO GENOMA DO *H. seropedicae* QUE CONTÉM O GENE *glnD*



As setas indicam o sentido de transcrição dos genes.



|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 676 | CGG CTG GAC CAT CAA GAC CAA GGA TCG CAG CCT CTC GGC GCA GTG | 720 |
| 226 | R L D H Q D Q G S Q P L G A V                               | 240 |
| 721 | GGA ACA TAC GGT GCT GGT CAC CGA AAC CGG CTT CGA AGT GCT GAC | 765 |
| 241 | G T Y G A G H R N R L R S A D                               | 255 |
| 766 | CGT CTC ACC AGG CAT GCC GGC GCC GCC GGC CTT CAT CCA GAA CCA | 810 |
| 256 | R L T R H A G A A G L H P E P                               | 270 |
| 811 | GGC CAC CGC CGC AGC CTG AAC CGG ACT GGC GCA GCA AGA CCG TGA | 855 |
| 271 | G H R R S L N R T G A A R P *                               |     |

CGCCGGCGACCCCTGCACACGGCTTCCGGCATGAAACCTGCTAAGGGCATGGGGCCGCATGGGG  
 ATGCGGCCCTGTTTCATTTCCAGCGGCCCGCCCGCCCTGCCTTCATTGATCGATTCCAACG

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 1   | ATG CCC ACT CTC GCC ATC ACG CTC AAG AAA CAA CTC AAG GCT GCG | 45  |
| 1   | M P T L A I T L K K Q L K A A                               | 15  |
| 46  | CGC CAG CAG GCC ATC GAG GTG TTC CAG TCC AAC CAC AAG ACC GAG | 90  |
| 16  | R Q Q A I E V F Q S N H K T E                               | 30  |
| 91  | CAG TTG CTG GCG CAG TTG CGC CGC ACC GTC GAT GAG GCC CTC ACC | 135 |
| 31  | Q L L A Q L R R T V D E A L T                               | 45  |
| 136 | CAG GCC TGG GAG GCC CTG GGC ATG TCC GGC AAC GCC GCA CTG GTG | 180 |
| 46  | Q A W E A L G M S G N A A L V                               | 60  |
| 181 | GCC GTG GGC GGC TAT GGC CGC GGC GAA CTG TTC CCG CAT TCC GAC | 225 |
| 61  | A V G G Y G R G E L F P H S D                               | 75  |
| 226 | GTG GAC GTG CTG ATC CTG CTG GAC AAG GCG CCG GAC GCC GGC AAG | 270 |
| 76  | V D V L I L L D K A P D A G K                               | 90  |
| 271 | AAA GAG AAG CTG GAA TCG CTG GTG CAG CTG TTC TGG GAC ATC GGC | 315 |
| 91  | K E K L E S L V Q L F W D I G                               | 105 |
| 316 | CTG GAG ATC GGC CAC AGC ATC CGC ACC ATC GAT GAA TGC CTG GAC | 360 |
| 106 | L E I G H S I R T I D E C L D                               | 120 |
| 361 | GAG TCC GCC GCC GAC ATC ACG GTA CAG ACC AGC CTG CTG GAA GCG | 405 |
| 121 | E S A A D I T V Q T S L L E A                               | 135 |
| 406 | CGC CTG GTG ACC GGC AGC CGC GCC CTG TTC AAG CAG CTG CAG GAA | 450 |
| 136 | R L V T G S R A L F K Q L Q E                               | 150 |
| 451 | CGC TAC CAG GCC GCC CTG GAC CCG CTG GCC TTC TTC CAG GCC AAG | 495 |
| 151 | R Y Q A A L D P L A F F Q A K                               | 165 |
| 496 | ACG CTG GAG ATG CGC CAG CGT CAT GTG AAA TAT GAA GAC ACG CCC | 540 |
| 166 | T L E M R Q R H V K Y E D T P                               | 180 |
| 541 | TAC AGC CTG GAA CCC AAC TGC AAG GAA AGC CCC GGC GGC CTG CGT | 585 |
| 181 | Y S L E P N C K E S P G G L R                               | 195 |
| 586 | GAC CTG CAG GTG ATC CTG TGG GTG GCC AAG GCG GCC GGC CTG GGC | 630 |
| 196 | D L Q V I L W V A K A A G L G                               | 210 |
| 631 | CAC TCC TGG AGC GAA CTG GCC GAA CAC GGC ATG CTC ACT TCC ACC | 675 |
| 211 | H S W S E L A E H G M L T S T                               | 225 |

|      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 676  | GAA | GCG | CGC | CAG | CTG | CGC | CAG | AAG | GAA | CGC | GCC | TTC | AAG | GAC | ATC | 720  |
| 226  | E   | A   | R   | Q   | L   | R   | Q   | K   | E   | R   | A   | F   | K   | D   | I   | 240  |
| 721  | CGC | ATC | CGC | CTG | CAC | ATC | CTC | ACC | GAT | CGC | CGC | GAA | GAC | CGC | CTG | 765  |
| 241  | R   | I   | R   | L   | H   | I   | L   | T   | D   | R   | R   | E   | D   | R   | L   | 255  |
| 766  | GTG | TTC | GAC | ATC | CAG | ACG | CAG | ATC | GCC | GAA | ACC | TTC | GGC | TTC | AAG | 810  |
| 256  | V   | F   | D   | I   | Q   | T   | Q   | I   | A   | E   | T   | F   | G   | F   | K   | 270  |
| 811  | ACC | ACC | GAC | ACC | CGG | CGC | GCC | AGC | GAA | TAC | CTG | ATG | CAG | CGC | TAC | 855  |
| 271  | T   | T   | D   | T   | R   | R   | A   | S   | E   | Y   | L   | M   | Q   | R   | Y   | 285  |
| 856  | TAC | TGG | GCC | GCC | AAG | GCA | GTC | ACC | CAA | CTC | AAC | ACC | ATC | CTG | CTG | 900  |
| 286  | Y   | W   | A   | A   | K   | A   | V   | T   | Q   | L   | N   | T   | I   | L   | L   | 300  |
| 901  | CAG | AAC | ATC | GAG | GCG | CAC | CTC | TTC | CCG | CAG | CAA | GCC | GTG | CCG | CGC | 945  |
| 301  | Q   | N   | I   | E   | A   | H   | L   | F   | P   | Q   | Q   | A   | V   | P   | R   | 315  |
| 946  | CAG | ATC | AAC | GAG | CGC | TTC | AAT | GAG | GTC | AAC | GGT | TTT | GTC | GAT | ATC | 990  |
| 316  | Q   | I   | N   | E   | R   | F   | N   | E   | V   | N   | G   | F   | V   | D   | I   | 330  |
| 991  | GCC | CAC | GAC | CAT | GTC | TTC | GAA | GAG | ACG | CCC | TCG | GCC | ATG | CTG | GAA | 1035 |
| 331  | A   | H   | D   | H   | V   | F   | E   | E   | T   | P   | S   | A   | M   | L   | E   | 345  |
| 1036 | GTG | TTT | CTG | GTG | CTG | TCC | CAG | CAT | GCC | GAG | CTC | AAG | GAC | ATG | TCG | 1080 |
| 346  | V   | F   | L   | V   | L   | S   | Q   | H   | A   | E   | L   | K   | D   | M   | S   | 360  |
| 1081 | GCC | CGC | ACC | ATG | CGC | GCG | CTC | TGG | CAT | GCC | CGC | TTC | AAG | ATC | GAC | 1125 |
| 361  | A   | R   | T   | M   | R   | A   | L   | W   | H   | A   | R   | F   | K   | I   | D   | 375  |
| 1126 | AAC | GCC | TTC | CGC | AAC | AAT | CCC | GAG | AAC | CAC | CGG | CTG | TTC | ATG | CAG | 1170 |
| 376  | N   | A   | F   | R   | N   | N   | P   | E   | N   | H   | R   | L   | F   | M   | Q   | 390  |
| 1171 | ATC | CTG | CAA | AGC | AAG | CGC | GGC | ATC | ACC | CAC | GCG | CTG | CGC | CGC | ATG | 1215 |
| 391  | I   | L   | Q   | S   | K   | R   | G   | I   | T   | H   | A   | L   | R   | R   | M   | 405  |
| 1216 | AAC | GCC | ACC | AGC | GTG | CTG | GGA | CGC | TAC | CTG | CCC | AAC | TTC | CGC | CAG | 1260 |
| 406  | N   | A   | T   | S   | V   | L   | G   | R   | Y   | L   | P   | N   | F   | R   | Q   | 420  |
| 1261 | ATC | GTC | GGC | CAA | ATG | CAG | CAC | GAC | CTG | TTC | CAC | GTC | TAC | ACG | GTG | 1305 |
| 421  | I   | V   | G   | Q   | M   | Q   | H   | D   | L   | F   | H   | V   | Y   | T   | V   | 435  |
| 1306 | GAC | CAG | CAC | ATC | CTG | ATG | GTG | GTG | CGC | AAT | GTG | CGC | CGC | TTC | ACC | 1350 |
| 436  | D   | Q   | H   | I   | L   | M   | V   | V   | R   | N   | V   | R   | R   | F   | T   | 450  |
| 1351 | ATG | AGC | GAA | CAC | GCC | CAC | GAA | TAC | CCC | TTC | TGC | AGC | CAA | CTG | ATG | 1395 |
| 451  | M   | S   | E   | H   | A   | H   | E   | Y   | P   | F   | C   | S   | Q   | L   | M   | 465  |
| 1396 | GCC | AAC | TTC | GCC | CAG | CCC | TGG | GTG | CTC | TAC | GTG | GCT | GCA | CTC | TTC | 1440 |
| 466  | A   | N   | F   | A   | Q   | P   | W   | V   | L   | Y   | V   | A   | A   | L   | F   | 480  |
| 1441 | CAC | GAT | ATC | GCC | AAG | GGC | CGC | GGC | GGC | GAC | CAC | TCC | AAG | CTG | GGC | 1485 |
| 481  | H   | D   | I   | A   | K   | G   | R   | G   | G   | D   | H   | S   | K   | L   | G   | 495  |
| 1486 | ATG | GCT | GAC | GCC | CGC | GCC | TTC | TGC | GTC | CAG | CAT | GGC | ATT | TCG | CCG | 1530 |
| 496  | M   | A   | D   | A   | R   | A   | F   | C   | V   | Q   | H   | G   | I   | S   | P   | 510  |
| 1531 | GAA | AAC | ACC | GAT | CTC | ATC | GTC | TTC | CTG | GTG | GAG | CAG | CAC | CTG | GCC | 1575 |
| 511  | E   | N   | T   | D   | L   | I   | V   | F   | L   | V   | E   | Q   | H   | L   | A   | 525  |



|      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 1576 | ATG | TCG | CAT | GTG | GCG | CAG | AAG | CAG | GAC | ATG | TCC | GAC | CCC | GAC | GTC | 1620 |
| 526  | M   | S   | H   | V   | A   | Q   | K   | Q   | D   | M   | S   | D   | P   | D   | V   | 540  |
| 1621 | ATC | ACC | GCC | TTC | GCC | CAG | TTG | GTC | AAG | GAC | GAG | CGC | CAT | CTC | ACA | 1665 |
| 541  | I   | T   | A   | F   | A   | Q   | L   | V   | K   | D   | E   | R   | H   | L   | T   | 555  |
| 1666 | GCG | CTC | TAC | CTG | CTG | ACG | GTG | GCC | GAT | ATT | CGC | GGC | ACC | AGC | CCC | 1710 |
| 556  | A   | L   | Y   | L   | L   | T   | V   | A   | D   | I   | R   | G   | T   | S   | P   | 570  |
| 1711 | AAG | GTC | TGG | AAC | GCC | TGG | AAG | GGC | AAG | CTG | CTG | GAA | GAT | CTC | TAC | 1755 |
| 571  | K   | V   | W   | N   | A   | W   | K   | G   | K   | L   | L   | E   | D   | L   | Y   | 585  |
| 1756 | CGC | ATG | ACC | CTG | CGC | GTG | CTG | GGC | GGC | GAA | GAA | CCT | TCG | GCC | GAC | 1800 |
| 586  | R   | M   | T   | L   | R   | V   | L   | G   | G   | E   | E   | P   | S   | A   | D   | 600  |
| 1801 | CGC | GAA | CTC | AAG | AAT | ACC | CAG | CAG | GAA | GCC | ATC | AAG | ACC | CTG | CGC | 1845 |
| 601  | R   | E   | L   | K   | N   | T   | Q   | Q   | E   | A   | I   | K   | T   | L   | R   | 615  |
| 1846 | CTG | TAC | GGC | CTG | CCG | GCC | GAT | GCC | CAC | GAA | CAG | CTG | TGG | AAG | CAG | 1890 |
| 616  | L   | Y   | G   | L   | P   | A   | D   | A   | H   | E   | Q   | L   | W   | K   | Q   | 630  |
| 1891 | CTC | GAC | GTA | GCC | TAT | TTC | CTG | CGC | CAC | GAC | GCC | TCC | GAC | ATT | GCC | 1935 |
| 631  | L   | D   | V   | A   | Y   | F   | L   | R   | H   | D   | A   | S   | D   | I   | A   | 645  |
| 1936 | TGG | CAG | ACG | CGC | TGC | TTC | TTC | GAC | AAG | GTC | GAT | ACC | GCC | GTG | CCG | 1980 |
| 646  | W   | Q   | T   | R   | C   | F   | F   | D   | K   | V   | D   | T   | A   | V   | P   | 660  |
| 1981 | CTG | GTG | CGC | TGC | CGC | CTC | GCG | CCC | ATC | GGC | GAG | GGG | GTG | CAG | GTG | 2025 |
| 661  | L   | V   | R   | C   | R   | L   | A   | P   | I   | G   | E   | G   | V   | Q   | V   | 675  |
| 2026 | GCG | GTC | TAC | ACG | CCG | GAC | CGG | CAA | GAC | CTC | TTC | GCC | CGC | ATC | TGC | 2070 |
| 676  | A   | V   | Y   | T   | P   | D   | R   | Q   | D   | L   | F   | A   | R   | I   | C   | 690  |
| 2071 | AGC | TAC | TTC | GAC | GAA | AAG | AGC | TTC | AGC | ATC | TTC | GAC | GCC | AAG | ATC | 2115 |
| 691  | S   | Y   | F   | D   | E   | K   | S   | F   | S   | I   | F   | D   | A   | K   | I   | 705  |
| 2116 | CAC | ACC | ACC | CGC | AAC | AAT | TAC | GCG | CTG | GAC | GCC | TTC | CTG | ATC | AAT | 2160 |
| 706  | H   | T   | T   | R   | N   | N   | Y   | A   | L   | D   | A   | F   | L   | I   | N   | 720  |
| 2161 | GCC | CCG | GTC | TTC | GCC | AAG | AAC | TAC | CGC | GAC | ATC | ATC | AAC | CTG | ATC | 2205 |
| 721  | A   | P   | V   | F   | A   | K   | N   | Y   | R   | D   | I   | I   | N   | L   | I   | 735  |
| 2206 | GAG | CAC | GAG | CTG | GGC | GCG | CTG | CTG | CAA | TCC | GAA | GAG | CCC | TTG | CCG | 2250 |
| 736  | E   | H   | E   | L   | G   | A   | L   | L   | Q   | S   | E   | E   | P   | L   | P   | 750  |
| 2251 | GCA | CCC | TCC | AAG | GCC | CGA | CTG | TCG | CGC | CTG | TCG | CGC | ACC | TTC | CCG | 2295 |
| 751  | A   | P   | S   | K   | A   | R   | L   | S   | R   | L   | S   | R   | T   | F   | P   | 765  |
| 2296 | GTC | AAT | CCG | GCG | GTG | GAC | CTG | CGC | CCC | GAC | GAG | CGC | GGC | CAG | TAC | 2340 |
| 766  | V   | N   | P   | A   | V   | D   | L   | R   | P   | D   | E   | R   | G   | Q   | Y   | 780  |
| 2341 | TAC | CTG | CTG | TCG | ATC | TCG | GCC | AAT | GAC | CGC | GCC | GGC | CTG | CTC | TAT | 2385 |
| 781  | Y   | L   | L   | S   | I   | S   | A   | N   | D   | R   | A   | G   | L   | L   | Y   | 795  |
| 2386 | TCG | ATC | TCC | AAC | GTG | CTG | GCC | AAG | TAC | AAG | ATC | AAC | CTG | CAT | ACC | 2430 |
| 796  | S   | I   | S   | N   | V   | L   | A   | K   | Y   | K   | I   | N   | L   | H   | T   | 810  |
| 2431 | GCC | AAG | GTG | ATG | ACC | CTG | GGC | GAG | CGG | GTG | GAA | GAC | GTC | TTC | CTC | 2475 |
| 811  | A   | K   | V   | M   | T   | L   | G   | E   | R   | V   | E   | D   | V   | F   | L   | 825  |

2476 ATC GAT GGT CCG GGC CTG TCG CAG CCG CGC AAC CAG ATC CTG CTG 2520  
826 I D G P G L S Q P R N Q I L L 840

2521 GAA ACC GAT CTG CTC AAG ACC CTG CGC ATC TGA 2553  
841 E T D L L K T L R I \*

TCCAC**CGCCGCGGGGCGC**CTGCTGCGGT**GGCGCGGCGGCCCGC**TTGGCCGTACAATCTCACC  
CTCGCCGCTGGCCGGCTTCCGTTTTTCGCAAGGCAATCCCCATGACTGAACCCGTACGACTTT

Região cromossômica do genoma do *H. seropedicae* compreendendo os genes *map* (em magenta) e *glnD* (em azul) e seus respectivos aminoácidos. As prováveis regiões promotoras AAGACA –N<sub>16</sub> – TACATT (em vermelho) e AACAGA – N<sub>16</sub> – TATAAT (em verde) foram localizadas a montante do gene *map* nas posições –236 e –65 pb, respectivamente. A jusante do gene *glnD* foi localizada uma região rica em GC (negrito) seguida por uma seqüência rica em TA (sublinhada), sugerindo que a terminação de transcrição do gene *glnD* ocorra de maneira independente do fator rho.

A análise da seqüência de aminoácidos da proteína GlnD de *H. seropedicae* apontou a presença de domínios conservados (FIGURA 8). A seqüência entre as posições 40 e 133 possui alta similaridade com o domínio nucleotidiltransferase (pf01909), que provavelmente constitui o sítio ativo da enzima (HOLM e SANDER, 1995). Neste domínio foi encontrado o motivo (AVGGYGR-X<sub>2</sub>-L-X-P-X-SDIDLL) que é altamente conservado em todas as proteínas GlnD conhecidas até o momento.

Entre os resíduos 431 a 578 foi encontrado o domínio HD (pf01966), conhecido pela atividade fosfohidrolase em proteínas envolvidas no metabolismo dos ácidos nucléicos e na transdução de sinais (ARAVIND e KOONIN, 1998). Nesse domínio foram encontrados 10 resíduos de histidina e 10 resíduos de aspartato que podem estar envolvidos na atividade da enzima via coordenação com metais divalentes.

A seqüência da região 781-848 possui homologia com o domínio ACT (pf01842) (ARAVIND e KOONIN, 1999b). Este domínio é conhecido por desempenhar um papel regulatório e está presente na maioria das proteínas com atividade controlada em resposta a variação da concentração de um determinado aminoácido. Portanto, na proteína GlnD de *H. seropedicae*, este domínio pode estar

envolvido no controle da atividade de GlnD pela concentração de glutamina na célula. Como ocorre na proteína GlnD de *E. coli* e de outros organismos, foi identificado uma segunda cópia do domínio ACT entre os aminoácidos 673 e 747. Chipman e Shaanan (2001) citam que em proteínas que possuem 2 cópias do domínio ACT, o nível de conservação da seqüência é maior em uma das cópias, dificultando a detecção da segunda cópia pelos programas de identificação de domínios, como foi constatado no caso do *H. seropedicae*.

Além desses domínios, entre os resíduos 7 e 132, uma região similar a proteína GlnE foi encontrada que corresponde ao domínio nucleotidiltransferase. As semelhanças entre GlnD de GlnE sugerem que estas tenham mesma origem evolutiva (ARAVIND e KOONIN, 1999a). Ambas estão envolvidas na transdução de sinais e apresentam o domínio nucleotidiltransferase conectado com um domínio de regulação por aminoácidos. As duas proteínas catalisam a ligação de um nucleotídeo mono-fosfato a um resíduo específico de tirosina e estão sujeitas aos efeitos recíprocos de glutamina e 2-oxoglutarato. Além disso, GlnD e GlnE competem pelo mesmo substrato (GlnB e GlnB-UMP) de tal forma que a adição crescente de GlnE no sistema de uridililação inibe as atividades de GlnD (ENGLEMAN e FRANCIS, 1978).

A comparação da estrutura primária da proteína GlnD de *H. seropedicae* com a GlnD de outros organismos mostra que os aminoácidos mais conservados estão situados nas regiões compreendidas pelos domínios nucleotidiltransferase, HD e ACT (FIGURA 9).

**FIGURA 8.** LOCALIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS CONSERVADOS NA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae*

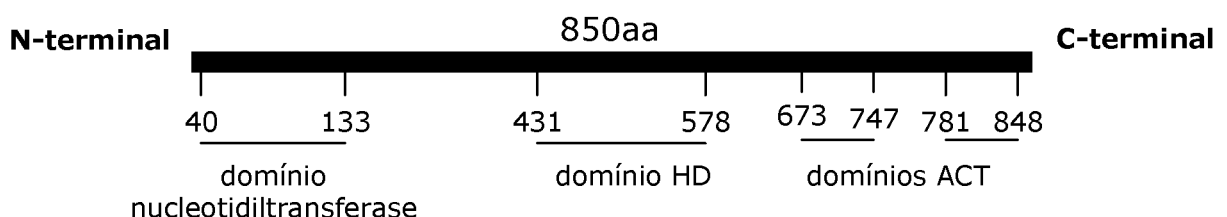


FIGURA 9. COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae* COM A PROTEÍNA GlnD DE OUTROS ORGANISMOS

|                       |   |     |
|-----------------------|---|-----|
| <i>H. seropedicae</i> | -----MPT-----LAI TLKKQLKAARQQAI EVFQSNHKTEQL                        | 32  |
| <i>R. eutropha</i>    | -----MDTTPPELLLAARVRDQLKADKQALFADFDLSSHVGTLL                        | 37  |
| <i>C. violaceum</i>   | -----MTLS--AAPLQHWRTLAEKRQQQLADAYRADRDAPAF                          | 35  |
| <i>A. vinelandii</i>  | -----MPQVDPDLDFDPGQFQAE LALKSSPI PAYKKALRCAREVLDARFQEGRDIRRL        | 52  |
| <i>E. coli</i>        | MNTLPEQYANTALPTLPGPQPNPCVWPRDELTVGGIKAHIDTFQRWLGDADFNGISAEQL        | 60  |
|                       | : : : . : . :   |     |
|                       | <b>1→</b>   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | LAQLRRTVDEALTQAWEE--ALGMSGNAALVAVGGYGRGELFPHSDVDVLIILLDKAPDAGK      | 90  |
| <i>R. eutropha</i>    | VTRLRRRAVDAALAEAWR--GLDMPADAALVAVGGYGRGELFPYSDVDVLLLLRAEPDADT       | 95  |
| <i>C. violaceum</i>   | LRRYSQAVDQTLAALWR--EQGLDGOAALAVGGYGRGQLFPCSDVDLILLLPDPTPAEI         | 93  |
| <i>A. vinelandii</i>  | I EDRAWFVDQILALAWNRFDSWEDADIALI AVGGYGRGELHPYSDIDLLILMDGADHEVF      | 112 |
| <i>E. coli</i>        | I EARTEFIDQLLQRLWIEAGFSQIADLALVAVGGYGRGELHPLSDVDLILSRKKLPDDQ        | 120 |
|                       | : : * * * . . : ** ***** : * * * * : * : *                          |     |
|                       | <b>←1</b>   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | KEKLESIVQLFWDIGLEIGHISIRTI DECLDESAAADITVQTSLL EARLVTGSRALFKQLQE    | 150 |
| <i>R. eutropha</i>    | VSRLERFIGMCWDLGLEIGSSVRTVEDCIREARADITIQTSLL EARLLTGNRKLFEALRT       | 155 |
| <i>C. violaceum</i>   | NDKVSHFIGLMWDIGLEIGHISVRTLDECLREAAGDIT IETNLL ENRLVAGPAEPWRELMR     | 153 |
| <i>A. vinelandii</i>  | REP IEGFLLTLLWDIGLEVQSVRS LAECAEEAQADLTVITNLMESRTIAGPEHLRQRQF       | 172 |
| <i>E. coli</i>        | AQKVGELLTLLWDVKLEVGHSVRTL EECMLEGLSDLT VATNLIESRLLIGDVALFLELQK      | 180 |
|                       | . : : : ** : ** : * * : : * * . * : * : * * * * : *                 |     |
| <i>H. seropedicae</i> | RYQAA--LDPLAFFQAKTLEMRQRHVKYEDTPYSLEPNCKESPGGLRDLQVILWVAKAAG        | 208 |
| <i>R. eutropha</i>    | QHQAQ--LDPAAFFQAKLLEMRQRHAKYQDTPYALEPNCKESPGGLRDLQVILWMTKAAG        | 213 |
| <i>C. violaceum</i>   | RLEAQ--RDPLAFFEGKTL EQQRHTRHFGVSNLEPNLCKESPGGLRDLHTILWISKAAG        | 211 |
| <i>A. vinelandii</i>  | V TSAQRMWPSRAFFLAKRDEQKTRHARYNDTEYNLEPNVKGSPGGLRDIQTLLWIARRQF       | 232 |
| <i>E. coli</i>        | HIFSEGFWPSDKFYAAKVEEQNRHQRYHGTSYNLEPDIKSSPGGLRDIHTLQWVARRHF         | 240 |
|                       | : . * : * * . * * : : . . * * * : * * * * * : : : * : :             |     |
| <i>H. seropedicae</i> | LGHWSSELAEHGMLTSTEARQLRQKERAFKDIRIRLHILTD RREDRLVFDIQTQIAETFG       | 268 |
| <i>R. eutropha</i>    | LGD SWKELFERGLLTQREAEQLSRNERLLKTIRARLHLVAGRRQDVLFDLQTALAESFG        | 273 |
| <i>C. violaceum</i>   | LGNWDSLVRRI LTLAEARLIKHS EEQLQLLRVLDLHLLARRREDRLIFDLQQVVAQAWG       | 271 |
| <i>A. vinelandii</i>  | GTINLHAMVGGFLLSEYTL LASSQEF LWKVR YALHMLAGRAEDRLLFDLQRQIAGLLG       | 292 |
| <i>E. coli</i>        | GATSLDEMVGFGFLTSAERAELNECLHILWRIRFALHLVVSRYDNRLLFDRLSVAQRLN         | 300 |
|                       | . : * : * * * : : . : : * * * : : * : * * * * : *                   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | FKTTDTRRASEYLMQRYWAAKAVTQLNTILLQNI EAHLFP--QQAVPRQINERFNEVNG        | 326 |
| <i>R. eutropha</i>    | YRQANKRASEQLMRRYFWAAKAVTQLNSVLLLNIEALLFPS-ESQVTRVINERFVERQG         | 332 |
| <i>C. violaceum</i>   | LADTPAKRASEQLMQLYFRAAKTINQLNGILLPNLRGRIYQC-VPRVTQHI SEYFHAVNG       | 330 |
| <i>A. vinelandii</i>  | YEDSDAKLAVERFMQKYRVVVLGIAELTELVFQHFEEVILPGDAAGRVEPLNERFQVRDG        | 352 |
| <i>E. coli</i>        | YS-GE GNEPVERMMKDYFRVTRRVSELNQLMLLQLFDEAILALPADEKPPRIDDEFQLRGT      | 359 |
|                       | . . * : * : * * . . : : * . : : : : : : : : : : * : : *             |     |
| <i>H. seropedicae</i> | FVDIAHDHVFEETPSAMLEVFLVLSQHAELKDMSARTMRALWHARFKIDNAFRNNPENHR        | 386 |
| <i>R. eutropha</i>    | MLEITSDSLYEDDPHAILETFLLYERTPGIKGLSPRTL RGLYNARTVM DARWRSDPENRR      | 392 |
| <i>C. violaceum</i>   | MLGIREVNVFDKHPHAI LEAFLTLQRHPELSGFAPRMLRALWHGRSQINDRFRSDPRNRA       | 390 |
| <i>A. vinelandii</i>  | YLEVTHAGVFQETPSALLEIFVLLARRPEIRGVRADTIRLLRDHRYLIDDAFRRDPHNTG        | 412 |
| <i>E. coli</i>        | LIDL RDETLFMRQPEAILRMFYTMVHNSAITGIYSTTLRQLRHARRHLQQPLCNIP EARK      | 419 |
|                       | : : : : * * : * * . * : : . . . : * * . * : : * .                   |     |
|                       | <b>2→</b>   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | LFMQILQSKRGITHALRRMNATSVLGRYLPNFRQIVGQM QHDLFHVYTVDQHILMVVRNV       | 446 |
| <i>R. eutropha</i>    | LFLAILQEPQGITHALRLMNQTSVLGRYLINFRRI VGMQHDLFHVYTVDQHILMVVRNM        | 452 |
| <i>C. violaceum</i>   | TFMQIFREPSGLTRTLRRMNLYGILGQYLPNFGQIVGQM QHDLFHVYTVDEHILMVVRNL       | 450 |
| <i>A. vinelandii</i>  | LFTIELFKSRQGIHRNLRMMNRYGILGRYLP EFGHIVGQM QHDLFHIYTVDAHTLNLIKNL     | 472 |
| <i>E. coli</i>        | LFLSILRHPGAVRRGLLPMHRHSVLGAYMPQWSHIVGQM QFDLFHAYTVDEHTIRVMLKL       | 479 |
|                       | * : : : . : : * * : . * * * : : : * * * * * * * * * * * : : : :     |     |
| <i>H. seropedicae</i> | RRFTMSEHAHEYPFCSQLMANFAQPWVLYVAALFHDIAKGRGGDHSKLGMDARAFVCVQH        | 506 |
| <i>R. eutropha</i>    | RRFAIVEHTHEFPFCSQLMASFDKPVLSVAALFHDIAKGRGGDHSKLGTVDARRFCQKH         | 512 |
| <i>C. violaceum</i>   | RRFAISAYNHEYPFLSRLINDFERPEVLYLAGL FHDIAKGRGGDHSQLGIADADAF CRDH      | 510 |
| <i>A. vinelandii</i>  | RKLFWPELAEKYP LASKLIEKLPKPELIYLAGLYHDI GKGRGGDHS ELGAADALAF CQRH    | 532 |
| <i>E. coli</i>        | ESFASEETRQRHPLCVDVWVPRLPSTELIFIAALFHDIAKGRGGDHSILGAQDVVHFABELH      | 539 |
|                       | . : . . * : : : . : : : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * |     |

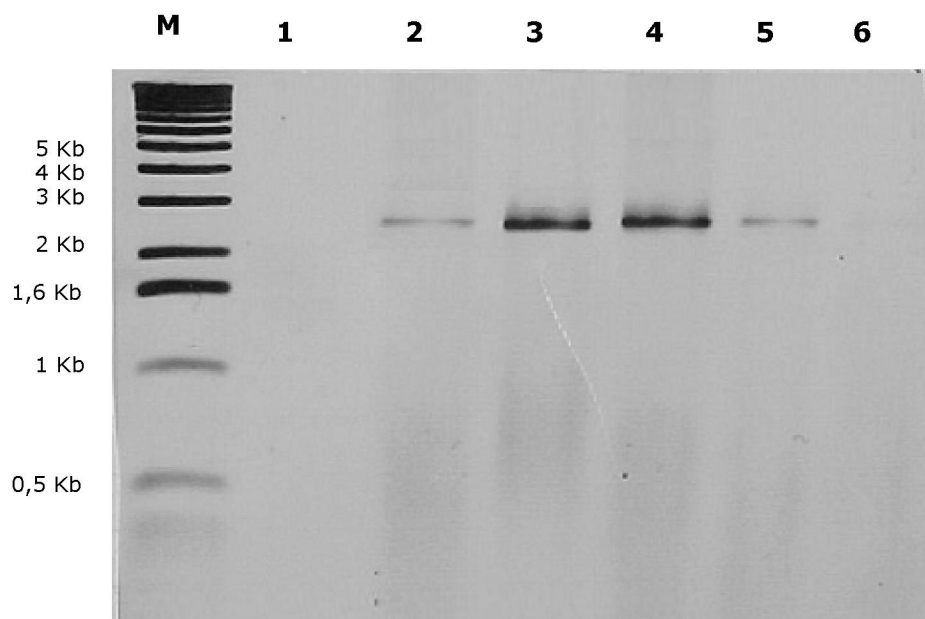
|                       |   |     |
|-----------------------|---|-----|
| <i>H. seropedicae</i> | <u>G</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>R</u>          | 566 |
| <i>R. eutropha</i>    | <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>R</u>                   | 572 |
| <i>C. violaceum</i>   | <u>G</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>R</u>          | 570 |
| <i>A. vinelandii</i>  | <u>D</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>C</u>                   | 592 |
| <i>E. coli</i>        | <u>G</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>C</u> | 599 |
|                       | . : : * : * : * * * * * : * : * : * : * : * * . * * * * * :   |     |
|                       | <b>←2</b>   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | <u>G</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> - <u>G</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>R</u> -- <u>E</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>A</u>                       | 623 |
| <i>R. eutropha</i>    | <u>G</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> - <u>G</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>S</u> -- <u>I</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>L</u>                       | 629 |
| <i>C. violaceum</i>   | <u>G</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u> -- <u>E</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>A</u>                         | 628 |
| <i>A. vinelandii</i>  | <u>A</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>D</u> | 652 |
| <i>E. coli</i>        | <u>A</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>A</u>                   | 659 |
|                       | . * . . : * * : * . * * : * * * : * : * * . : : * :   |     |
|                       | <b>3→</b>   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | <u>H</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>G</u> --- <u>V</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>P</u>                        | 680 |
| <i>R. eutropha</i>    | <u>G</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>G</u> --- <u>L</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>K</u>  | 686 |
| <i>C. violaceum</i>   | <u>E</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>G</u> --- <u>L</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>P</u>                        | 685 |
| <i>A. vinelandii</i>  | <u>A</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> | 712 |
| <i>E. coli</i>        | <u>L</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>H</u> - <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>G</u> --- <u>T</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>S</u> <u>P</u>                               | 715 |
|                       | : * : : * : * * . : * * : . : : . * * : : : :   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | <u>D</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>K</u> --- <u>N</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>H</u>                        | 737 |
| <i>R. eutropha</i>    | <u>D</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>H</u> | 746 |
| <i>C. violaceum</i>   | <u>D</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>G</u> -- <u>D</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>F</u>                         | 743 |
| <i>A. vinelandii</i>  | <u>Q</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>G</u> -- <u>N</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>Q</u>                | 771 |
| <i>E. coli</i>        | <u>D</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>S</u> --- <u>A</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>F</u>                        | 772 |
|                       | * : : * * . : . * : * * : * : : * : : : . : :   |     |
|                       | <b>←3</b> <span style="float: right;"><b>4→</b></span>  |     |
| <i>H. seropedicae</i> | <u>E</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> | 797 |
| <i>R. eutropha</i>    | <u>E</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>I</u>          | 806 |
| <i>C. violaceum</i>   | <u>E</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u>          | 803 |
| <i>A. vinelandii</i>  | <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> | 831 |
| <i>E. coli</i>        | <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>S</u> - <u>W</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>V</u>        | 831 |
|                       | * * * * * : * . : * * . * : : * : * * * * :   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | <u>S</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>G</u> ----- <u>L</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>P</u> - <u>R</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>L</u>  | 844 |
| <i>R. eutropha</i>    | <u>T</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>R</u> ----- <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>L</u>   | 854 |
| <i>C. violaceum</i>   | <u>A</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> A----- <u>L</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>D</u> - <u>K</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u>   | 850 |
| <i>A. vinelandii</i>  | <u>G</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>Y</u>                                     | 891 |
| <i>E. coli</i>        | <u>G</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>R</u> ----- <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>L</u>  | 880 |
|                       | . : : . : : : * : : * * * * * * : . :   |     |
|                       | <b>←4</b>   |     |
| <i>H. seropedicae</i> | <u>L</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> ---- 850  |     |
| <i>R. eutropha</i>    | <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>I</u> ---- 860  |     |
| <i>C. violaceum</i>   | <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> ---- 856  |     |
| <i>A. vinelandii</i>  | <u>I</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>I</u> -- 899  |     |
| <i>E. coli</i>        | <u>T</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>G</u> 890   |     |

Os domínios da proteína GlnD de *H. seropedicae* estão sublinhados e delimitados por setas e números: (1) domínio nucleotidiltransferase, (2) domínio HD, (3) e (4) domínio ACT. Os aminoácidos que fazem parte do motivo conservado (AVGGYGR-X<sub>2</sub>-L-X-P-X-SDIDLL) entre os resíduos 60 e 81 estão em negrito. Os aminoácidos idênticos estão marcados abaixo das seqüências com asteriscos e os sinais (: ) e (.) indicam aminoácidos de grupos semelhantes (aminoácidos em vermelho: hidrofóbicos, em verde: hidrofílicos, em azul: ácidos e hidrofílicos, em magenta: básicos e hidrofílicos).

4.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *glnD* DE *H. seropedicae*

Um fragmento de 2640 pb, contendo a região de 2553 pb que codifica para a proteína GlnD, foi amplificado a partir do DNA cromossomal de *H. seropedicae* utilizando a técnica da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores *HsglnDFoward* e *HsglnDReverse* apresentaram uma temperatura de anelamento ótima entre 50°C e 55°C (FIGURA 10).

**FIGURA 10.** PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *glnD* DE *H. seropedicae*



Eletroforese em gel de ágar 1% dos produtos de amplificação obtidos a diferentes temperaturas de anelamento utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *HsglnDFoward* e *HsglnDReverse*. M: marcador de tamanho molecular (Kb), **linha 1**: temperatura de anelamento de 40°C, **linha 2**: temperatura de anelamento de 45°C, **linha 3**: temperatura de anelamento de 50°C, **linha 4**: temperatura de anelamento de 55°C, **linha 5**: temperatura de anelamento de 60°C, **linha 6**: temperatura de anelamento de 65°C. O gel foi corado com brometo de etídio.

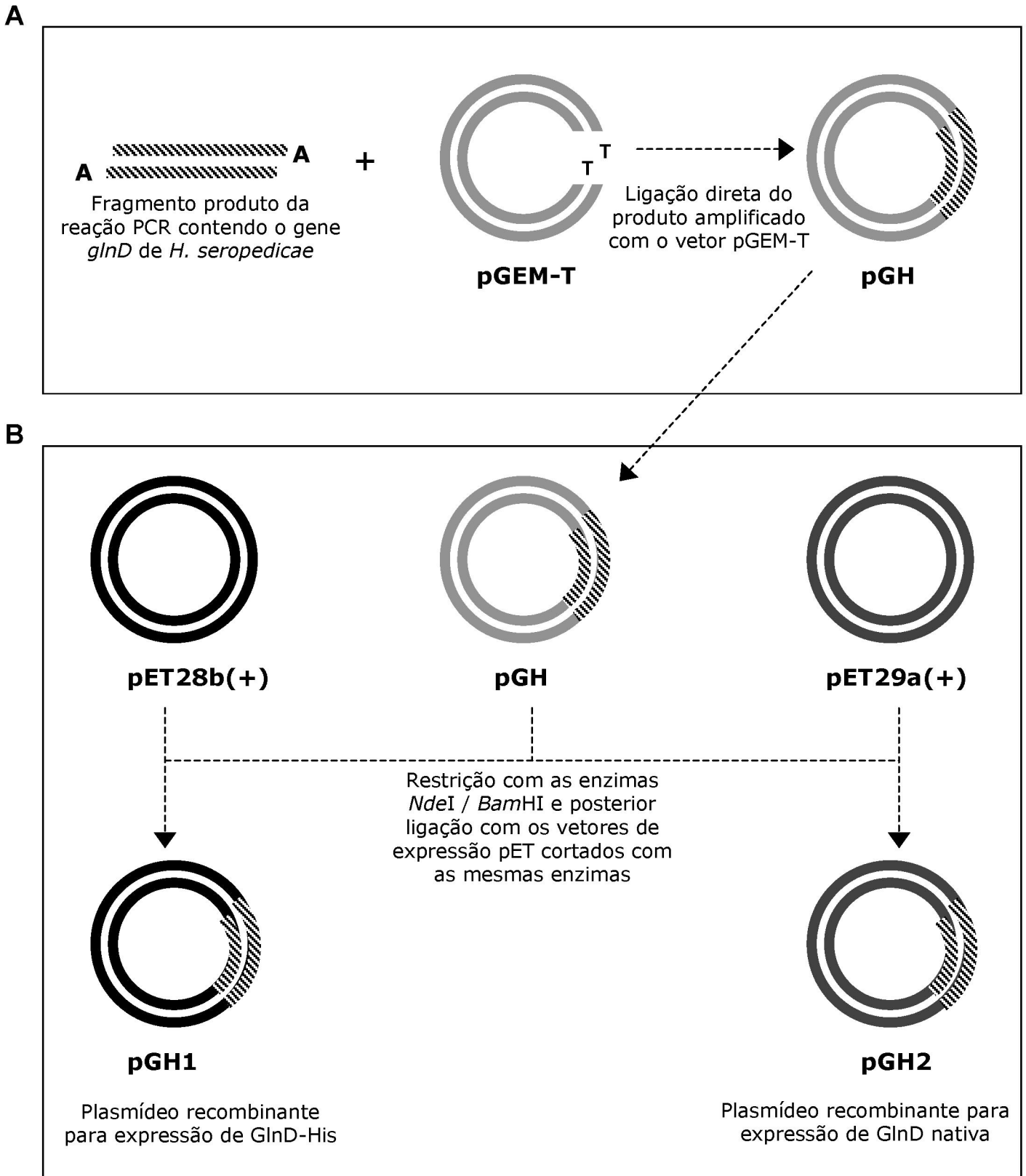
O gene *glnD* foi inicialmente clonado no vetor pGEM-T (Promega), utilizando a técnica de clonagem TA, dando origem ao plasmídeo recombinante pGH (FIGURA 11A). Esta técnica permite a clonagem direta do fragmento de DNA amplificado, aproveitando a atividade de transferase terminal da maioria das Taq polimerases (ZHOU e GOMEZ-SANCHEZ, 2000). Estas, por razões ainda desconhecidas, adicionam preferencialmente um resíduo de adenosina trifosfato na extremidade 3' na dupla fita ponta cega dos produtos de amplificação. Assim os fragmentos podem ser hibridizados a um vetor linearizado com extremidades 3' complementares.

A integridade da seqüência foi confirmada por análise de restrição e seqüenciamento. O gene *glnD* foi sub-clonado nos vetores de expressão pET28b(+) e pET29a(+), dando origem aos plasmídeos recombinantes pGH1 e pGH2 respectivamente (FIGURA 11B). O sistema pET foi escolhido por possibilitar alto nível de expressão da proteína associada. No caso do vetor pET28b(+) a proteína GlnD será expressa como uma proteína de fusão com um oligopeptídeo com 6 resíduos de histidina (His<sub>6</sub>) situado na extremidade N-terminal. Essa modificação permite a purificação da proteína por cromatografia de afinidade (ROSENBERG *et al.*, 1987).

#### 4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnD E GlnD-HIS DE *H. seropedicae* EM *E. coli*

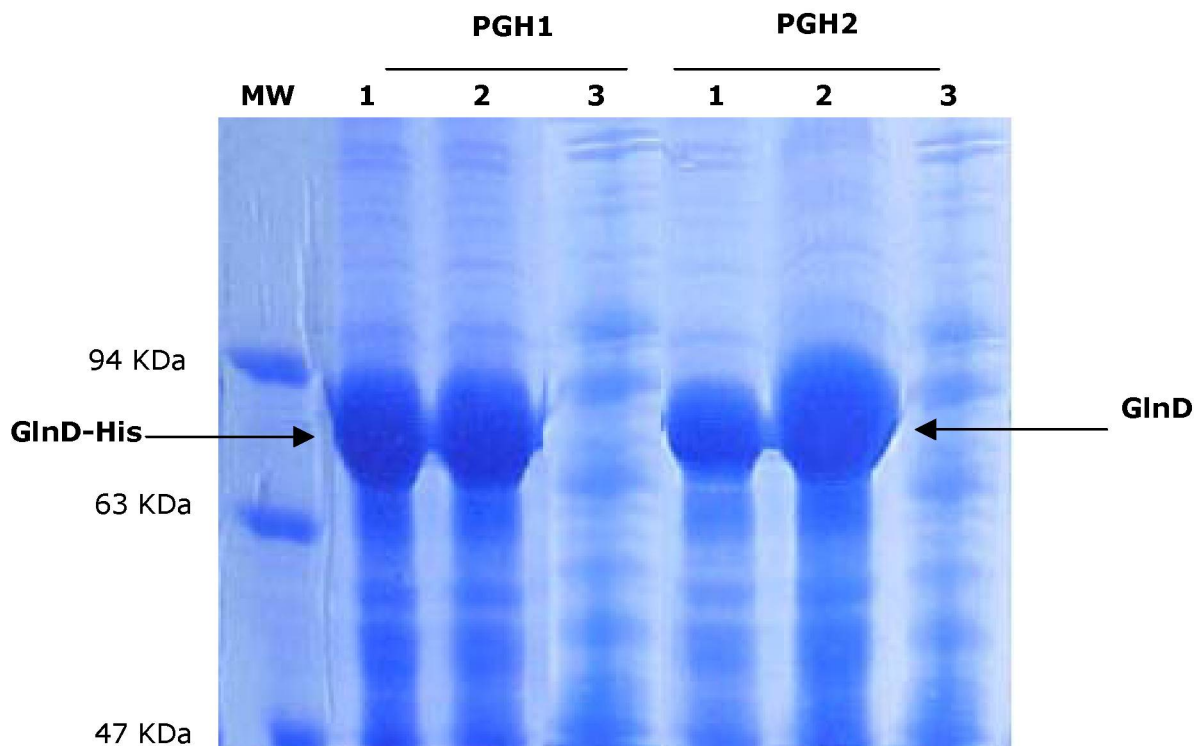
Os plasmídeos recombinantes capazes de expressar a proteína GlnD-His (pGH1) e GlnD na forma nativa (pGH2) foram transformados nas estirpes de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* e RB9065( $\lambda$ DE3). Essas estirpes são capazes de expressar a RNA polimerase do fago T7 após indução com IPTG ou lactose. As proteínas GlnD-His e GlnD foram primeiramente superexpressas na célula BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* para avaliar a eficiência de expressão nessas células. Uma banda com massa molecular de aproximadamente 93 KDa relativa à proteína GlnD foi observada no extrato celular das células BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* induzidas por IPTG (FIGURA 12).

FIGURA 11. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae*





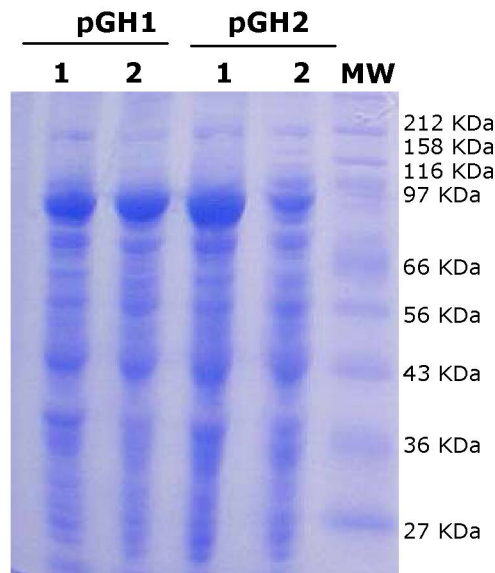
**FIGURA 12.** ELETROFORESE DO EXTRATO CELULAR DE *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS GlnD-HIS e GlnD NATIVA DE *H. seropedicae*



Perfil eletroforético em gel glicina SDS-PAGE 7,5% do lisado de células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* contendo os plasmídeos pGH1 e pGH2 após indução com 0,5mmol/L de IPTG durante 4 horas. MW: marcador de massa molecular, linhas 1: 30  $\mu$ g de proteína total, linhas 2: 50  $\mu$ g de proteína total, linhas 3: lisado de BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* com pGH1 ou pGH2 sem indução por IPTG. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.

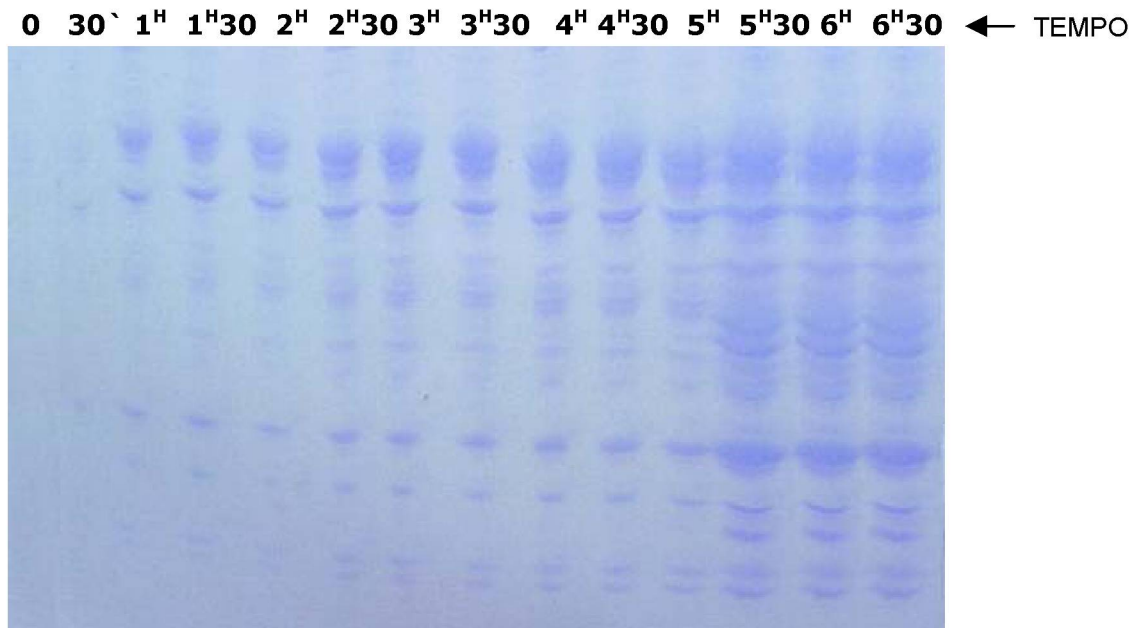
A estirpe RB9065( $\lambda$ DE3) é um duplo-mutante *glnB*<sup>-</sup> e *glnD*<sup>-</sup> que provém da estirpe RB9065 (BUENO *et al.*, 1985) infectada com o fago  $\lambda$ DE3 ( $\lambda$ DE3 Lysogenization Kit, Novagen) que a torna capaz de produzir RNA polimerase do fago T7 (BENELLI, 2001). Esta estirpe foi escolhida para expressão da proteína GlnD para evitar a contaminação da proteína GlnD de *H. seropedicae* com a proteína GlnD da célula hospedeira. Uma análise comparativa do nível de expressão de GlnD nas células BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* e RB9065( $\lambda$ DE3) mostrou que no caso da GlnD-His, a expressão foi semelhante em ambas células hospedeiras, enquanto que na GlnD nativa, o nível de expressão na estirpe RB9065( $\lambda$ DE3) foi um pouco menor (FIGURA 13). A indução com IPTG 0,5 mmol/L durante 4,5 horas foi suficiente para produzir GlnD em grande escala (FIGURA 14).

**FIGURA 13.** COMPARAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DE GlnD-HIS E GlnD NAS CÉLULAS BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* e RB9065( $\lambda$ DE3)



Perfil eletroforético SDS-PAGE 10% do lisado de células de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)*pLysS* (linhas 1) e RB9065( $\lambda$ DE3) (linhas 2) contendo os plasmídeos pGH1 e pGH2 após indução com 0,5 mmol/L de IPTG durante 4 horas. MW: marcador de massa molecular. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.

**FIGURA 14.** DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae* EM *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3)



Eletroforese SDS-PAGE 10% dos extratos protéicos totais da proteína GlnD de *H. seropedicae* com tempo de indução de 0 – 6<sup>h</sup>30. A proteína GlnD foi superexpressa na célula de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) a 30°C e coradas com Coomassie Blue R-250.

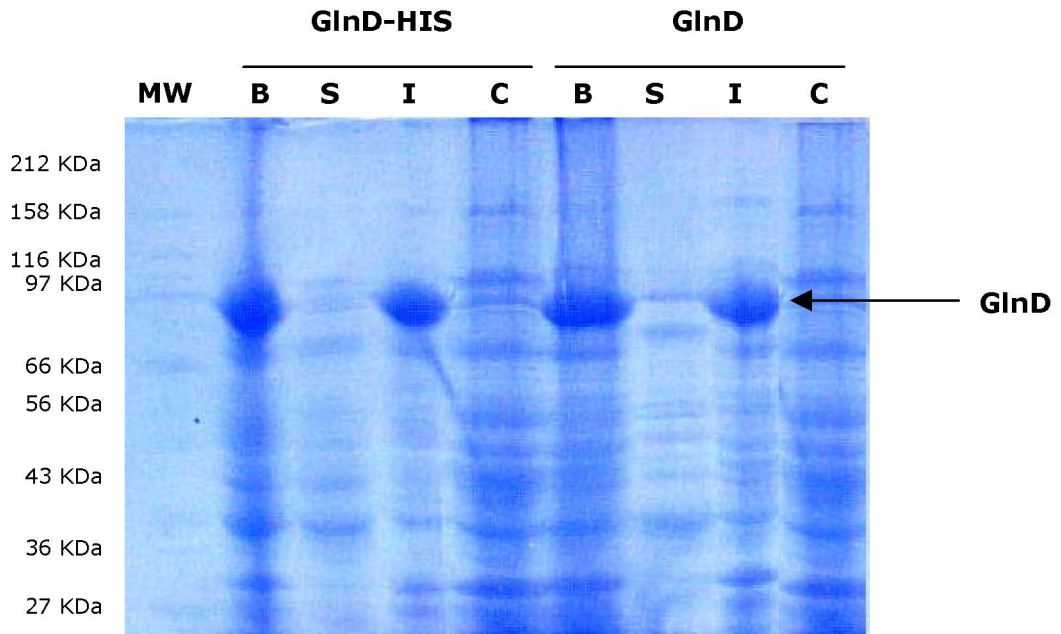
#### 4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O NÍVEL DE EXPRESSÃO E O GRAU DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD DE *H. seropedicae* SUPEREXPRESSA EM *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3)

Inicialmente, o comportamento da proteína GlnD de *H. seropedicae* foi analisado no tampão A200 utilizado no protocolo de purificação da GlnD de *E. coli* (KAMBEROV *et al.*, 1994). Nesta condição, a proteína GlnD superexpressa estava totalmente presente na fração insolúvel do lisado celular na forma de corpos de inclusão (FIGURA 15). Os corpos de inclusão são resultado da acumulação intracelular de proteínas dobradas parcialmente ou dobradas incorretamente formando agregados protéicos insolúveis e sem atividade. A formação dos corpos de inclusão está relacionada a uma falha e/ou sobrecarga do sistema de controle da qualidade de proteínas quando a célula é submetida a algum tipo de estresse, como a exposição a temperaturas elevadas ou superexpressão de proteínas recombinantes (GOTTESMAN *et al.*, 1997).

Diferentes procedimentos foram testados para obter aumento da fração solúvel desta proteína no tampão A200, tais como: diminuição da temperatura durante a indução, indução com menor concentração de IPTG, adição de  $MgCl_2$  ao tampão de lise, adição de detergentes não-iônicos (Triton X-100) e agentes redutores ao tampão. Os resultados mostraram que maior parte da proteína GlnD ou GlnD-His superexpressa continuava na fração insolúvel do lisado celular (dados não apresentados). A utilização de lactose como agente indutor (MONTEIRO *et al.*, 2000) mesmo em concentrações elevadas (0,2% - 1,0%) não foi suficiente para induzir a expressão de GlnD a partir do promotor T7.

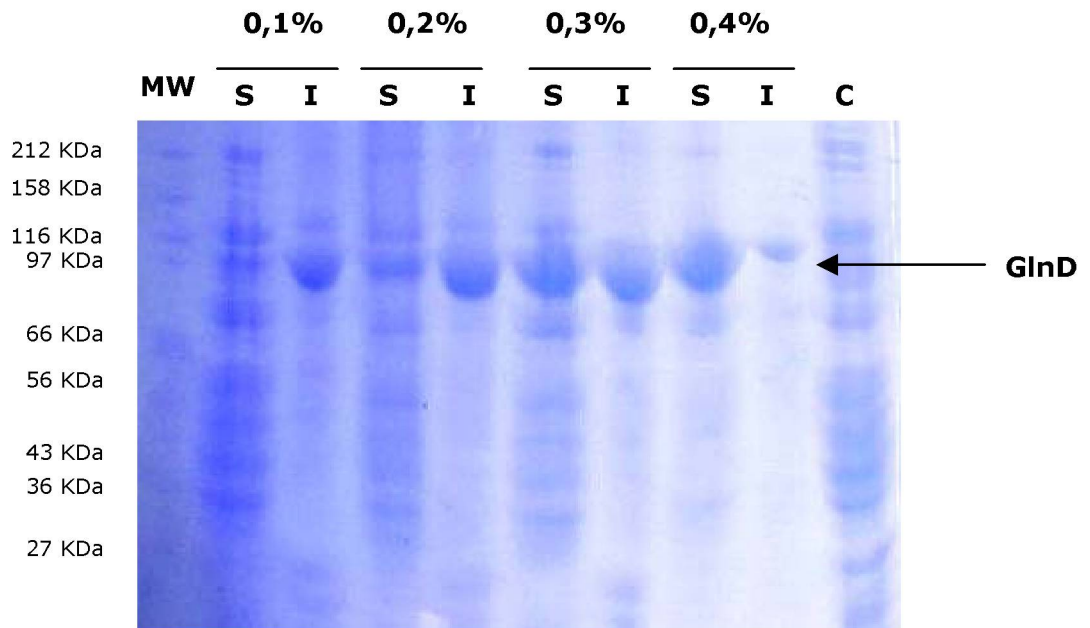
A adição de 0,4% de *N*-lauril-sarcosil ao tampão de lise permitiu manter grande parte (85%) da proteína GlnD superexpressa na forma solúvel (FIGURA 16). Todavia, a utilização de um detergente iônico forte como o *N*-lauril-sarcosil, faz com que a proteína assuma uma estrutura inativa devido à formação de complexos detergente/proteína, tornando obrigatório uma etapa posterior de renaturação da proteína. Devido ao tamanho da proteína GlnD (850 aminoácidos), é muito provável o rearranjo para uma conformação inativa. Além disso, o processo de renaturação sofre interferência de outras proteínas e impurezas presentes na solução (TSUMOTO *et al.*, 2003).

**FIGURA 15.** DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnD-HIS E GlnD DE *H. seropedicae* NAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS UTILIZANDO O TAMPÃO A200



Eletroforese SDS-PAGE 10% dos extratos protéicos totais (B), frações solúveis (S) e frações insolúveis (I) das proteínas GlnD-His e GlnD de *H. seropedicae* no tampão de lise A200 (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 200 mmol/L, glicerol 10% e DTT 1 mmol/L) descrito por Kamberov *et al.* (1994). As proteínas foram superexpressas na célula de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) a 30°C durante 4,5 horas após indução com 0,5 mmol/L de IPTG. Os controles (C) foram feitos com a célula RB9065( $\lambda$ DE3) transformada com pGH1 ou pGH2 sem indução por IPTG. O marcador de massa molecular está indicado por MW. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.

**FIGURA 16.** EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE *N*-LAURIL-SARCOSIL NA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE *H. seropedicae*



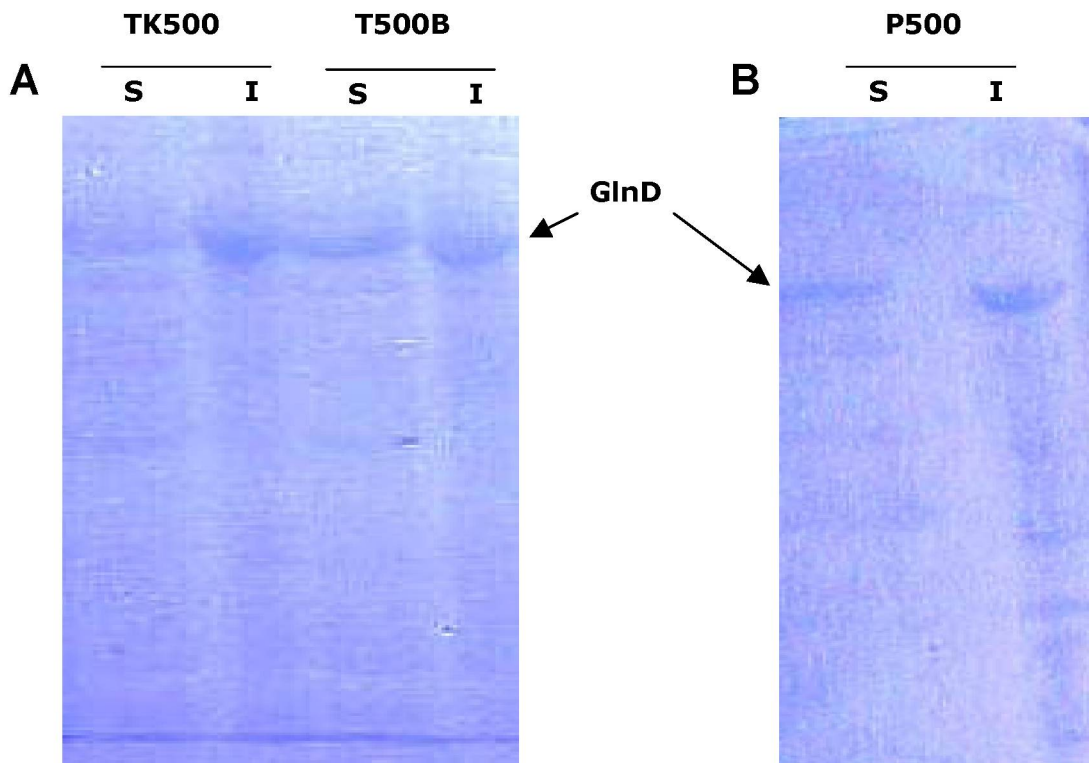
Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 10% das frações solúveis (S) e insolúveis (I) da proteína GlnD nativa em tampão de lise A200 contendo concentrações crescentes de *N*-lauril-sarcosil (0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%). As proteínas foram superexpressas na célula de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) a 30°C durante 4,5 horas após indução com 0,5 mmol/L de IPTG. O marcador de massa molecular está indicado por MW. O controle (C) foi feito com a célula RB9065( $\lambda$ DE3) transformada com pGH2 sem indução por IPTG. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.

A resposta da proteína GlnD de *H. seropedicae* frente ao tampão A200 utilizado para a purificação da GlnD de *E. coli* reforça a idéia de que cada proteína possui características químicas e físicas próprias. Estas características refletem o comportamento único da proteína frente à variação das condições do meio no qual está presente. Visando aumentar a solubilidade da proteína GlnD de *H. seropedicae* em um tampão de lise simples, sem a necessidade de detergentes, outras composições no tampão foram testadas.

A solubilidade da proteína GlnD aumentou significativamente com o aumento da força iônica (0,5 M de sal) e, sobretudo, com a substituição de KCl por NaCl (FIGURA 17A). O efeito de íons menores ( $\text{Na}^+$ ) podem ter causado menor separação eletrostática no sistema em relação aos íons maiores ( $\text{K}^+$ ), permitindo maior solubilização da proteína GlnD na solução tampão T500B (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mM) em relação ao tampão TK500 (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mM). Com relação ao tipo de tampão no sistema (Tris-HCl ou  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), a fração solúvel da proteína GlnD foi maior no tampão T500B que aquela presente no tampão P500 ( $\text{Na}_2\text{KPO}_4$  50 mM pH 7.5, NaCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mM) (FIGURA 17B). Kamberov *et al.* (1994) e Jiang *et al.* (1998) já haviam mencionado a maior estabilidade e atividade de GlnD em tampões Tris. Ambos os métodos de lise testados, sonicação e lise utilizando a Prensa de French, apresentaram resultados semelhantes (FIGURA 18A).

A solubilidade da proteína GlnD foi bastante influenciada pela temperatura de indução (FIGURA 18B). A indução durante 4 horas a uma temperatura de 37°C produziu a proteína GlnD totalmente insolúvel. Houve grande aumento da solubilidade da proteína GlnD nas induções realizadas a 30°C ou 23°C. Em estudos da expressão em *E. coli* de canamicina nucleotidiltransferase (KNTase), uma proteína da mesma família da GlnD, Liao (1991) sugere que a formação de corpos de inclusão, quando proteínas são superexpressas em *E. coli*, ocorre de maneira temperatura-dependente. A indução da expressão da GlnD a 37°C pode ter causado sua acumulação numa forma parcialmente dobrada formando agregados insolúveis.

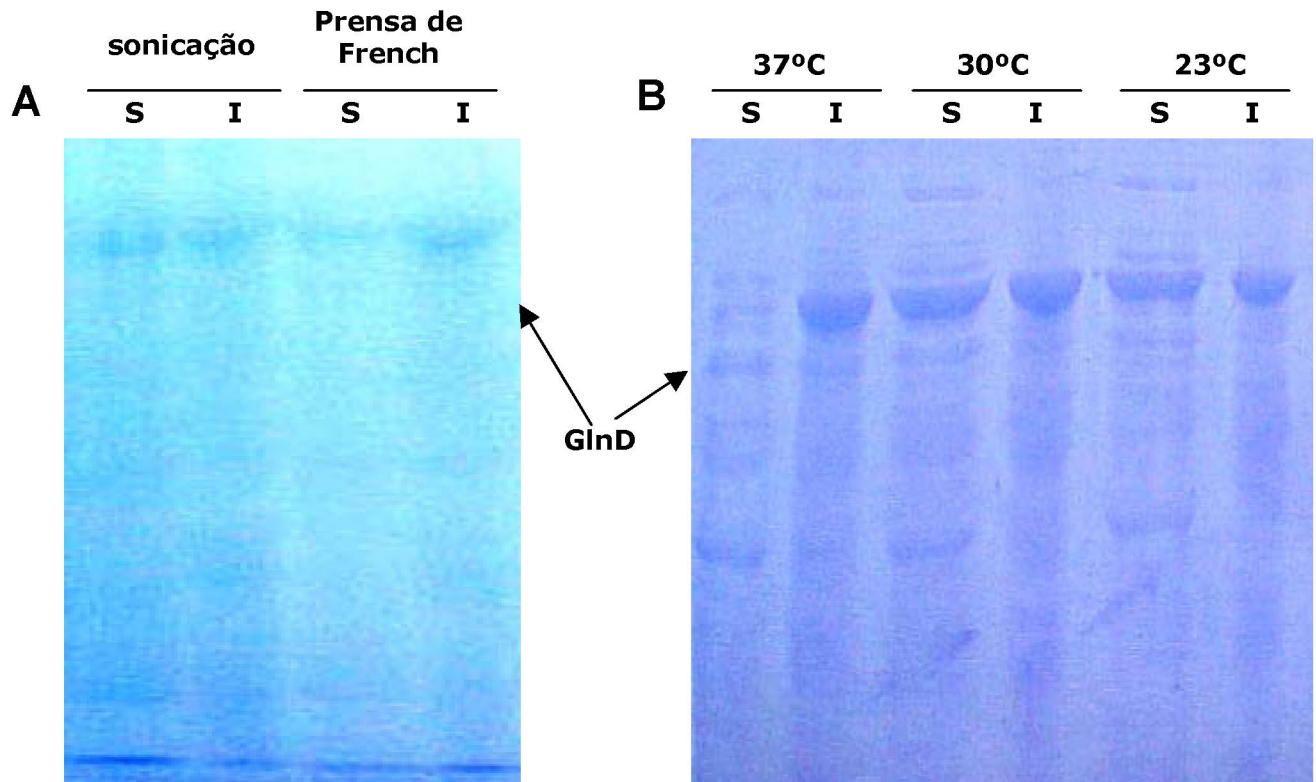
**FIGURA 17.** EFEITO DO TIPO DE SAL (KCl E NaCl) E DO TAMPÃO (Tris-HCl E NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) NA SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE *H. seropedicae*



Eletoforese SDS-PAGE 10% das frações solúveis (S) e frações insolúveis (I) da proteína GlnD de *H. seropedicae* no tampão de lise T500B (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, 0,5 M NaCl, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L), TK500 (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, 0,5 M KCl, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L) **(A)** e no tampão P500 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol/L pH 7,5, NaCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L) **(B)**. As proteínas foram superexpressas na célula de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) a 30°C durante 4,5 horas após indução com 0,5 mmol/L de IPTG. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.



**FIGURA 18.** EFEITO DO MÉTODO DE LISE E DA TEMPERATURA DE INDUÇÃO SOBRE A SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE *H. seropedicae*

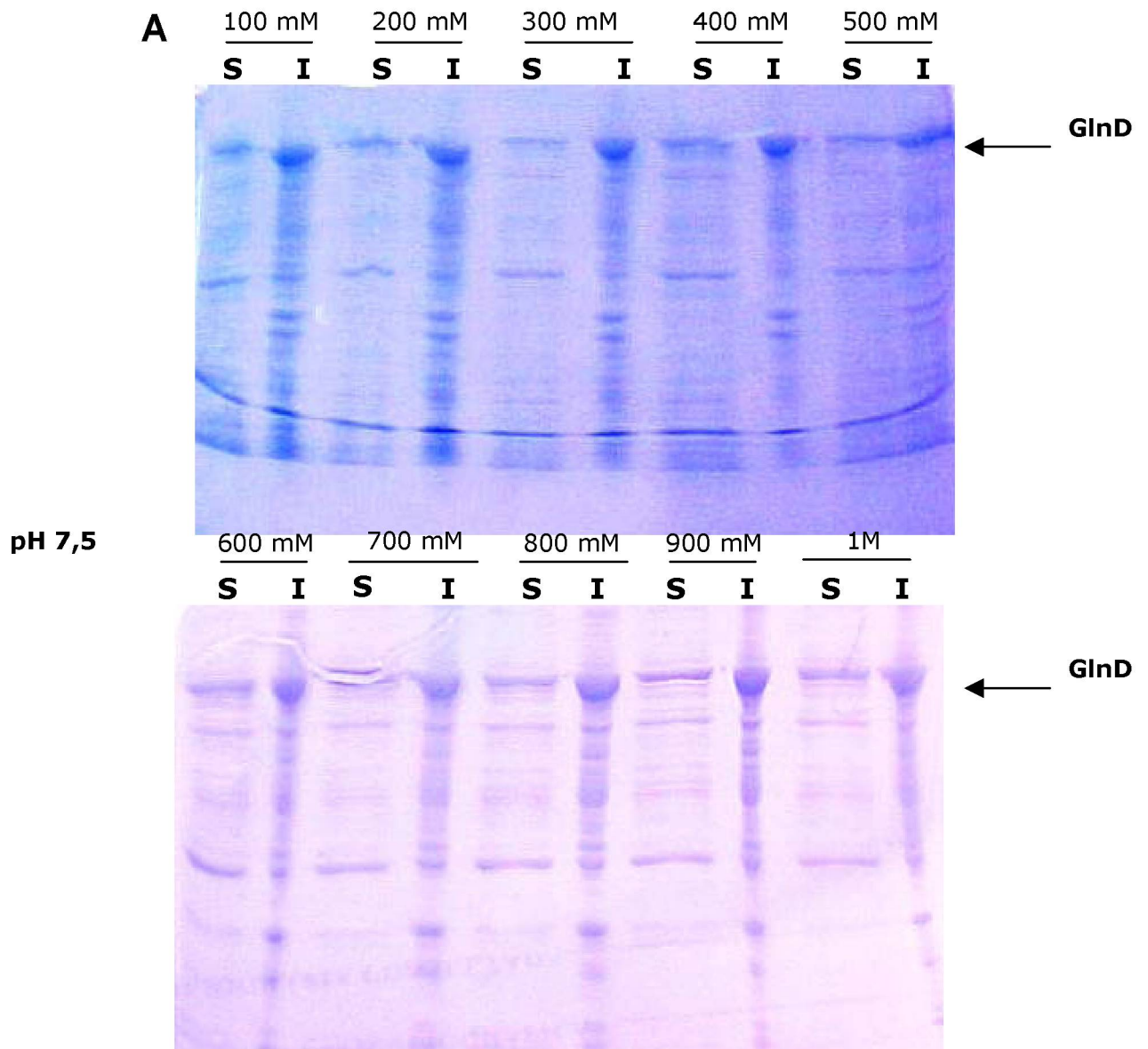


Eletoforese em gel SDS-PAGE 10% das frações solúveis (S) e frações insolúveis (I) da proteína GlnD de *H. seropedicae* no tampão de lise T500B (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, NaCl 0,5 M, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L) após lise das células por sonicação (10 ciclos de 10 segundos com 30 segundos de intervalo entre cada ciclo) ou lise com a Prensa de French (3 passagens a 3000 psi) **(A)**. Influência da temperatura de indução (37°C, 30°C ou 23°C) na solubilidade da proteína GlnD no tampão T500B **(B)**. As proteínas foram superexpressas em *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) durante 4,5 horas após indução com 0,5 mmol/L de IPTG. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.

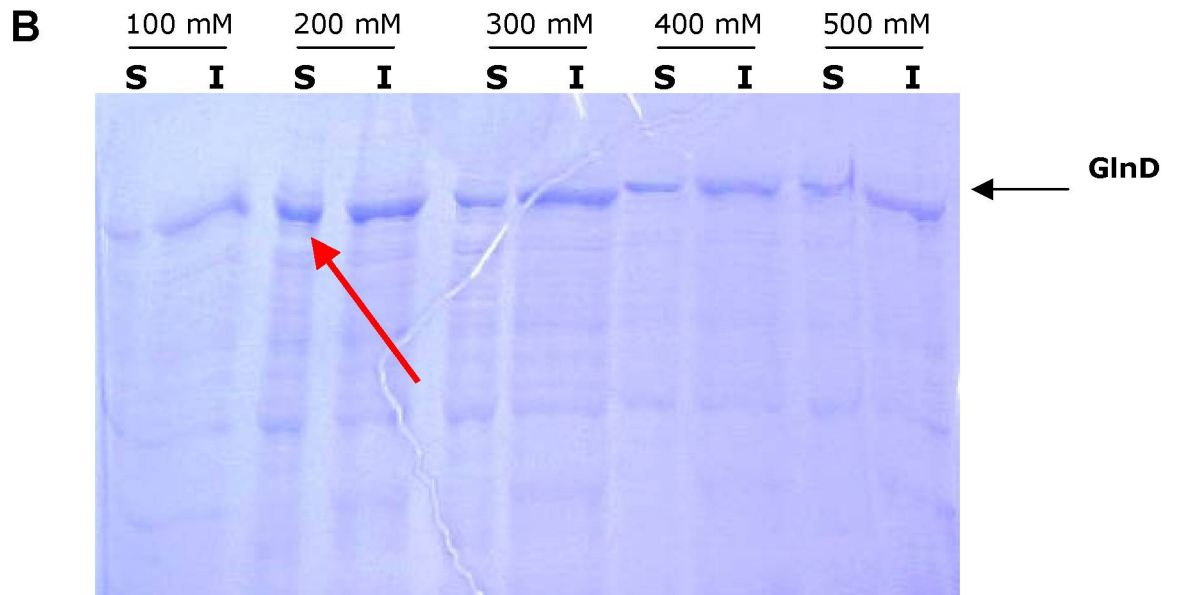
#### 4.5. OTIMIZAÇÃO DO TAMPÃO DE LISE

Na purificação de uma proteína em uma coluna de troca iônica, para que a interação da proteína com a matriz da coluna seja eficiente, é necessário que a proteína de interesse esteja solubilizada em um tampão com baixa força iônica. A partir da composição básica do tampão de lise T500B determinada anteriormente, foram testadas diferentes combinações entre a concentração de NaCl (100 mmol/L – 1 M) e o pH da solução tampão Tris (6.5, 7.0 e 7.5) (FIGURA 19). A lise das células realizada no tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, NaCl 200 mmol/L, glicerol 10% e DTT 1mmol/L (tampão T200) permitiu a solubilização da proteína GlnD em aproximadamente 50% (indicado por uma seta vermelha na FIGURA 19B).

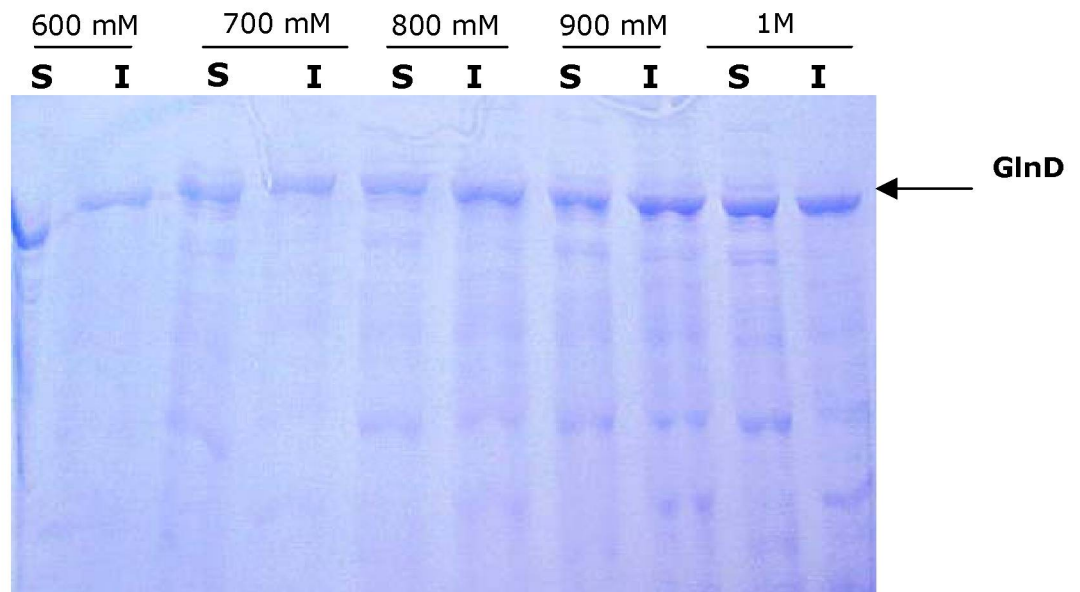
**FIGURA 19.** EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl E DO pH SOBRE A SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE *H. seropedicae*



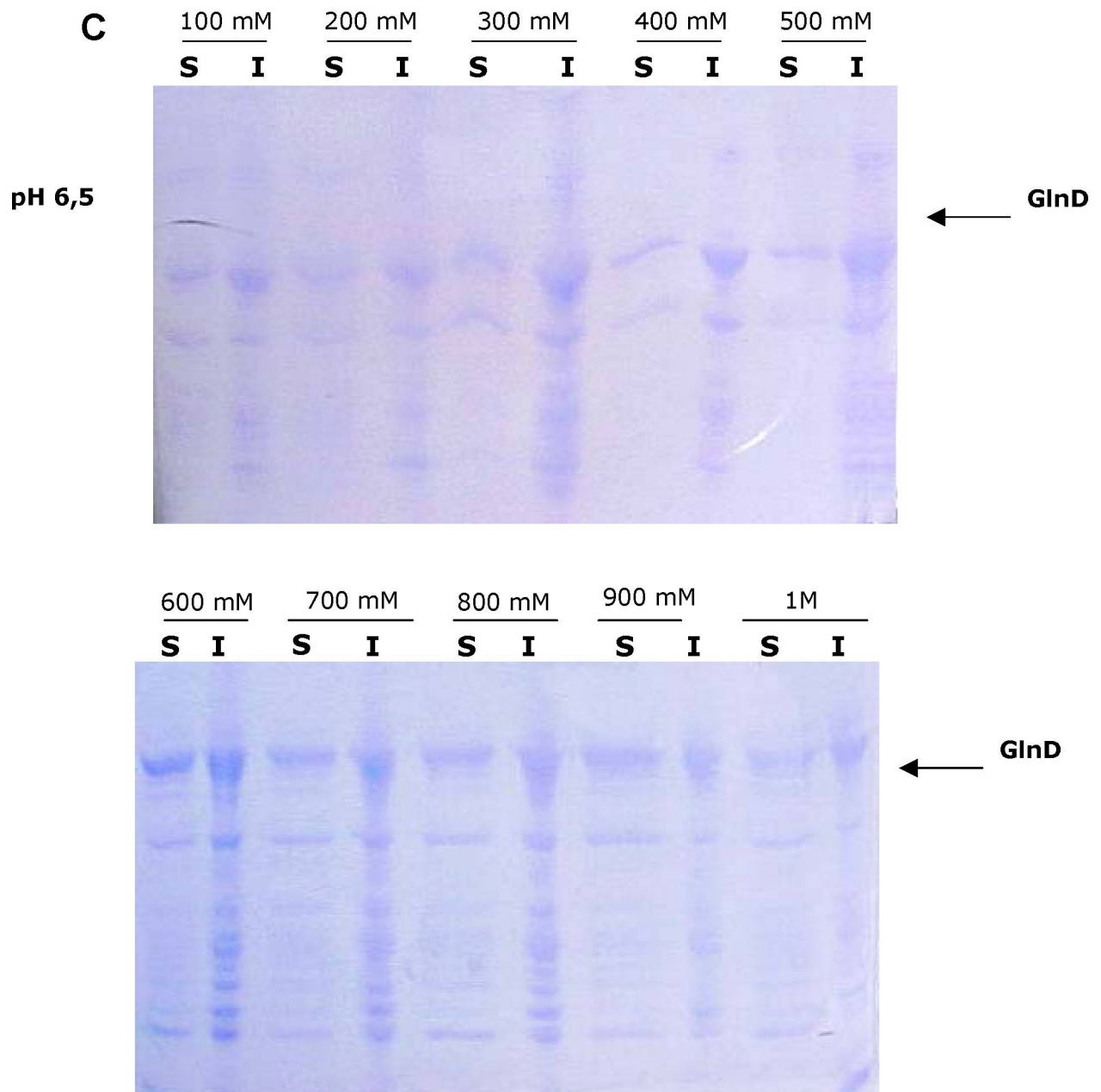
Eletroforese em SDS-PAGE 10% das frações solúveis (S) e frações insolúveis (I) da proteína GlnD de *H. seropedicae* no tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L **pH 7,5**, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L) variando a concentração de NaCl (100 mmol/L – 1 M). As proteínas foram superexpressas em *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) durante 4,5 horas após indução com 0,5 mmol/L de IPTG. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.



**pH 7,0**



Eletroforese em SDS-PAGE 10% das frações solúveis (S) e frações insolúveis (I) da proteína GlnD de *H. seropedicae* no tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L **pH 7,0**, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L) variando a concentração de NaCl (100 mmol/L – 1 M). A condição escolhida para purificação na coluna DEAE-Sepharose está indicada por uma seta vermelha.



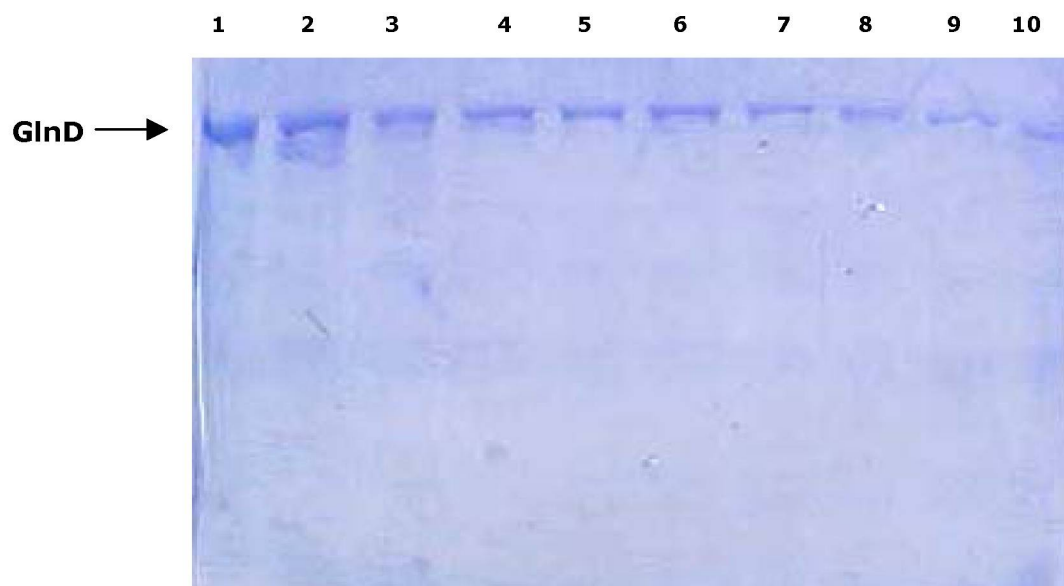
Eletroforese em SDS-PAGE 10% das frações solúveis (S) e frações insolúveis (I) da proteína GlnD de *H. seropedicae* no tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L pH 6,5, Glicerol 10%, DTT 1 mmol/L) variando a concentração de NaCl (100 mmol/L – 1 M).

#### 4.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD-His *H. seropedicae* POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE

O estudo do gene *glnD* e seu papel no sensoriamento do metabolismo nitrogenado, não só em *E. coli* mas também em outros organismos, foi bastante facilitado com o avanço das técnicas de clonagem de DNA e expressão e purificação de proteínas. Em 1980, foi possível expressar a proteína GlnD de *E. coli* numa taxa 14-25 vezes superior à expressão normal nas estirpes selvagens com a utilização de uma estirpe de *E. coli* que carrega múltiplas cópias do plasmídeo híbrido ColE1 contendo o gene *glnD* de *E. coli* (GARCIA *et al.*, 1980). Com o mesmo banco enriquecido, a proteína GlnD foi expressa e purificada de forma relativamente homogênea (GARCIA *et al.*, 1983). Com a construção do plasmídeo pDOP1, que possui o gene *glnD* controlado pelos promotores pR e pL do fago Lambda, a proteína GlnD de *E. coli* foi expressa e purificada de forma homogênea numa quantidade ainda maior (KAMBEROV *et al.*, 1994).

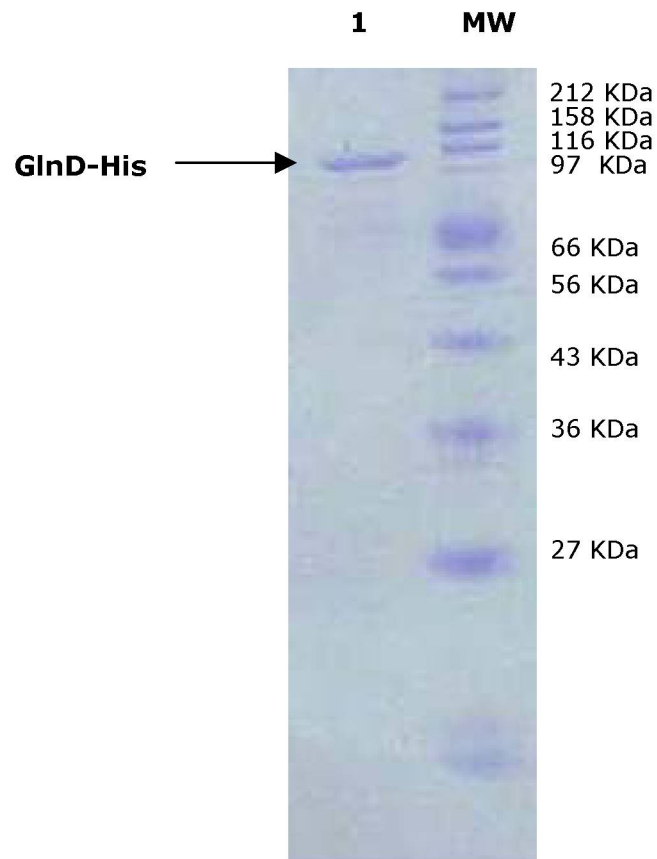
A proteína GlnD de *H. seropedicae* foi primeiramente purificada com uma cauda poli-histidina na sua extremidade N-terminal. Essa modificação na proteína permite que a purificação da proteína seja realizada pelo método cromatográfico de afinidade que se beneficia, no caso da proteína GlnD-His, das interações que ocorrem entre os resíduos expostos da proteína (His<sub>6</sub>) e os íons metálicos ligados a matriz (Ni<sup>2+</sup>). Após superexpressão na célula de *E. coli* RB9065(λDE3) contendo o plasmídeo pGH1, a proteína GlnD-His de *H. seropedicae* foi purificada numa coluna Hi-Trap Chelating Ni<sup>2+</sup> conforme o item 3.12 de Materiais e Métodos. A proteína GlnD-His foi eluída da coluna com o tampão 5 (contendo 500 mmol/L de imidazol) (FIGURA 20). As alíquotas mais puras da proteína foram reunidas em uma única fração, que teve sua pureza estimada através do método de coloração Coomassie Brilliant Blue Coloidal (FIGURA 21). Após análise densitométrica, a fração purificada apresentou uma pureza aproximada de 98% .

**FIGURA 20.** PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA GlnD-HIS DURANTE A PURIFICAÇÃO NA COLUNA HI-TRAP CHELATING



Eletroforese SDS-PAGE 10% das amostras eluídas da coluna Hi-Trap Chelating Ni<sup>2+</sup> com 500 mmol/L de imidazol (linhas 1 a 10). A proteína GlnD-His foi superexpressa em *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) durante 4,5 horas após a indução por IPTG 0,5 mmol/L. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.

FIGURA 21. ELETROFORESE DA PROTEÍNA GlnD-HIS PURIFICADA NA COLUNA DE AFINIDADE



Eletroforese em gel SDS-PAGE 10% da proteína GlnD-His de *H. seropedicae* purificada na coluna de afinidade Hi-Trap Chelating Ni<sup>2+</sup> (linha 1). Os marcadores de massa molecular estão indicados (MW). A proteína foi corada pelo método Coomassie coloidal.



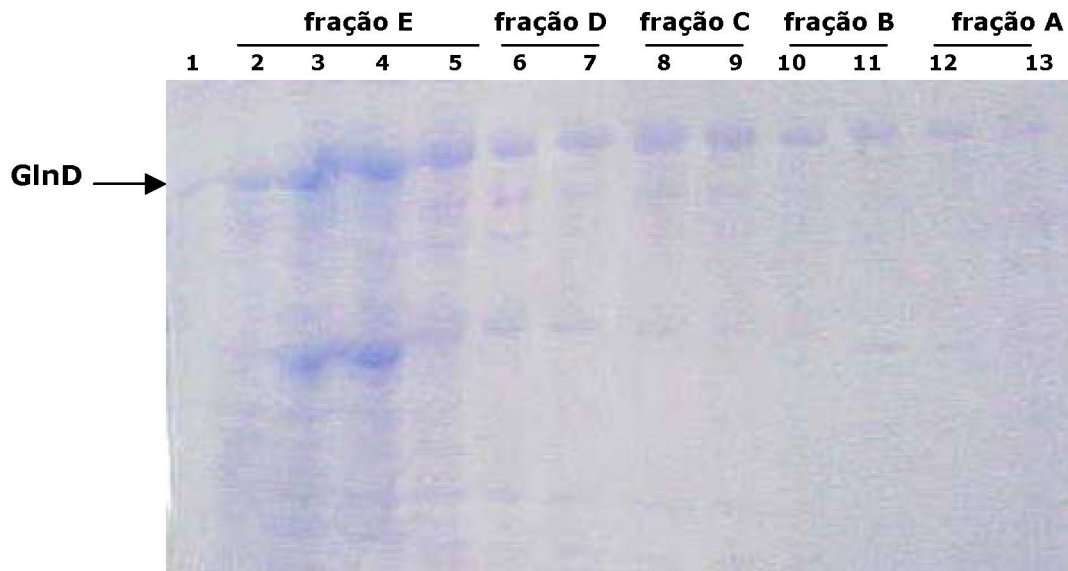
#### 4.7 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE *H. seropedicae* POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A proteína GlnD de *H. seropedicae* também foi parcialmente purificada na sua forma nativa. Após superexpressão na célula RB9065( $\lambda$ DE3) contendo o plasmídeo pGH2. O extrato bruto de células contendo a proteína GlnD nativa de *H. seropedicae* foi aplicado numa coluna de DEAE-Sepharose conforme o item 3.13 de Materiais e Métodos. A DEAE-Sepharose possui o grupo carregado positivamente constituindo uma matriz de troca aniônica. O pI mais baixo da proteína em relação ao pH do tampão de lise faz com que esta adquira carga negativa possibilitando a ligação com a matriz. A proteína GlnD foi eluída da coluna DEAE-Sepharose com aproximadamente 400 – 500 mmol/L de NaCl (FIGURA 22). As frações eluídas dentro dessa faixa foram separadas de acordo com o grau de pureza da proteína GlnD. As frações mais puras (linhas 12 e 13) foram agrupadas formando a **fração A**. As frações com menor homogeneidade foram unidas formando: **fração B** (linhas 10 e 11), **fração C** (linhas 8 e 9), **fração D** (linhas 6 e 7) e **fração E** (linhas 2, 3, 4 e 5).

Após coloração da fração A pelo método Coomassie Coloidal, foi verificada, além da banda correspondente à massa molecular da proteína GlnD, a presença de uma proteína contaminante com massa molecular de aproximadamente 27 kDa (FIGURA 23, linha 1). Nas frações B e C foram identificados 2 proteínas contaminantes com massa molecular aproximada de 27 kDa e 80 kDa (FIGURA 23, linha 1 e linha 2 respectivamente). Todas as frações foram dialisadas contra um tampão T200 contendo glicerol 50% e armazenadas em nitrogênio líquido.

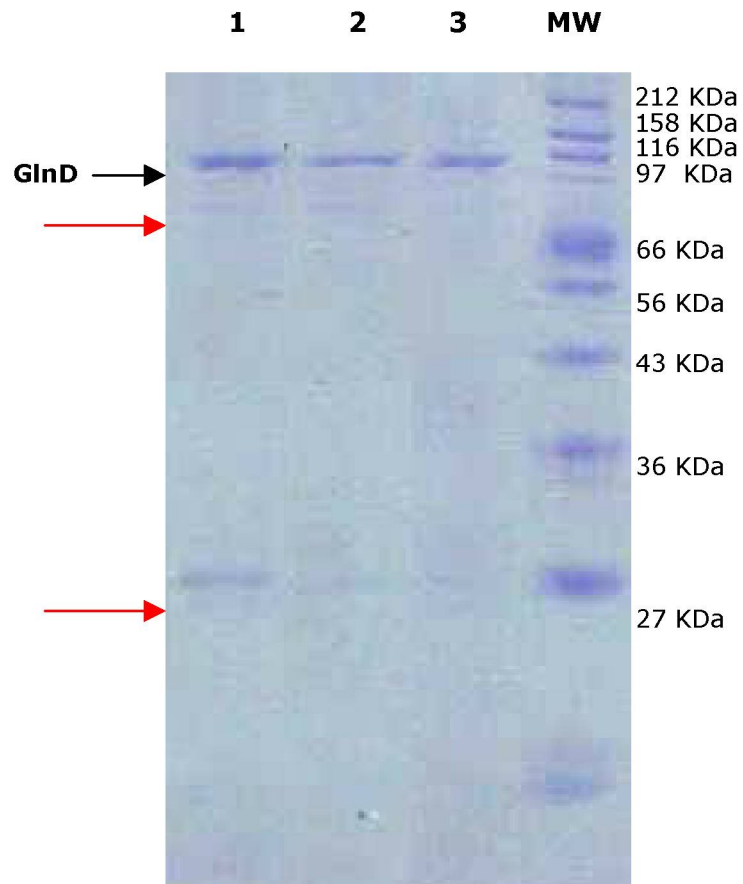
As frações parcialmente purificadas da proteína GlnD poderão ser utilizadas em novas etapas de purificação para obtenção da proteína numa forma mais homogênea. A purificação da proteína GlnD-His possibilitará a realização de estudos *in vitro* para elucidar sua função no mecanismo de sinalização de nitrogênio em *H. seropedicae*.

**FIGURA 22.** PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMOSTRAS ELUÍDAS NA COLUNA DEAE SEPHAROSE DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD NATIVA DE *H. seropedicae*



Eletroforese em SDS-PAGE 10% das amostras eluídas da coluna DEAE-Sepharose com 400 – 500 mmol/L de NaCl (linhas 1 a 13). A proteína GlnD foi superexpressa na célula de *E. coli* RB9065( $\lambda$ DE3) durante 4,5 horas após a indução por IPTG 0,5 mmol/L. As frações foram agrupadas de acordo com o grau de pureza da proteína GlnD. **fração E** (linhas 2, 3, 4 e 5), **fração D** (linhas 6 e 7), **fração C** (linhas 8 e 9), **fração B** (linhas 10 e 11) e **fração A** (linhas 12 e 13). As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250.

**FIGURA 23.** ELETROFORESE DA PROTEÍNA GlnD NATIVA PURIFICADA NA COLUNA DE TROCA IÔNICA



Eletroforese em gel SDS-PAGE 10% com as frações da proteína GlnD de *H. seropedicae* parcialmente purificada na coluna DEAE-Sepharose. As amostras foram eluídas da coluna de DEAE-Sepharose coradas pelo método de Coomassie coloidal. Fração C (linha 1), fração B (linha 2) e fração A (linha 3). Os marcadores de massa molecular estão indicados (MW).

## 5. CONCLUSÕES

- O gene *glnD* de *H. seropedicae* foi clonado nos vetores de expressão pET28b(+) e pET29a(+);
- A proteína GlnD de *H. seropedicae* foi superexpressa na sua forma nativa e associada a uma cauda His<sub>6</sub> em *E. coli* BL21(λDE3)pLysS e RB9065(λDE3);
- A proteína GlnD-His de *H. seropedicae* foi purificada, a partir da estirpe de *E. coli* RB9065(λDE3), em um passo cromatográfico com um grau de pureza de 98%;
- A proteína GlnD nativa de *H. seropedicae* foi parcialmente purificada, a partir da estirpe de *E. coli* RB9065(λDE3) na coluna de DEAE-Sepharose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER SP, PURISH D and STADTMAN ER (1975) Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase: properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylylremoving enzyme. *J. Biol. Chem.* v.250, p.6264-6272.

AN G, BENDIAK DS, MAMELAK LA, FRIESEN JD (1981) Organization and nucleotide sequence of a new ribosomal operon in *Escherichia coli* containing the genes for ribosomal protein S2 and elongation factor Ts. *Nucleic Acids Res.*, v.9, no.16, p. 4163-4172.

ANDERSON AJ and DAWES EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, v.54, p.450-472.

ARAVIND L, KOONIN EV (1998) The HD domain defines a new super-family of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.*, v.23, p.469-472.

ARAVIND L, KOONIN EV (1999a) DNA polymerase  $\beta$ -like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Research*, v.27, n.7, p.1609-1618.

ARAVIND L, KOONIN EV (1999b) Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J. Mol. Biol.*, v.287, p.1023-1040.

ARSÈNE F, KAMINSKI PA, AND ELMERICH C (1996) Modulation of NifA activity by P<sub>II</sub> in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J. Bacteriol.*, v. 178, p.4830-4838.

ATKINSON M R and NINFA AJ (1992) Characterization of mutations in the *glnL* gene of *Escherichia coli* affecting nitrogen regulation. *J. Bacteriol.*, v. 174, p.4538-4548.

ATKINSON MR, KAMBEROV ES, WEISS RL, NINFA AJ (1994) Reversible Uridylylation of the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Regulates Its Ability to Stimulate the Dephosphorylation of the Transcription Factor Nitrogen Regulator I (NRI or NtrC). *J. Biol. Chem.*, v.269, p.28288-28293.

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

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

BALDANI JI (1984a) Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 110p.

BALDANI JI, BALDANI VLD, SAMPAIO MJAM, DÖBEREINER J (1984b) A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *An. Acad. Bras. Cien.* vol.56, p.365.

BALDANI JI, BALDANI VLD, SELDIN L, DÖBEREINER J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.36, n.1, p.86-93.

BALDANI JI, CARUSO L, BALDANI VLD, GOI SR, DÖBEREINER J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.*, v.29, n.5/6, p.911-922.

BALDANI JI, POT B, KIRCHLAOF G, FALSEN E, BALDANI VLD, OLIVARES FL, HORTE B, KERSTERS K, HATMANN A, GILLIS M and DÖBEREINER J (1996) Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.46, p.802-810.

BALDANI VLD, BALDANI JI, OLIVARES F, DÖBEREINER J (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, v.13, p.65-73.

BANCROFT S, RHEE SG, NEUMANN C and KUSTU S (1978) Mutations that alter the covalent modification of glutamine synthetase in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, v.134, p.1046-1055.

BARRET J, RAY P, SOBCZYK A, LITTLE R, DIXON R (2001) Concerted inhibition of the transcriptional activation functions on the enhancer-binding protein NifA by the anti-activator NifL. *Mol. Microbiol.*, v.39, no.2, p.480-493.

BENELLI EM (1997) Análise Funcional e Estrutural da Proteína PII, Controladora da Fixação de Nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, 201 p., Tese de Doutorado.

BENELLI EM, BUCK M, DE SOUZA EM, YATES MG, PEDROSA FO (2001) Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. *Can. J. Microbiol.* v.47, no.4, p.309-314.

BENELLI EM, BUCK M, POLIKARPOV I, DE SOUZA EM, CRUZ LM and PEDROSA FO (2002) *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. *Eur. J. Biochem.*, v.269, p.329.

BENELLI EM, SOUZA EM, BONATTO AC, BUCK M, MOORE M, HARPER A, POLIKARPOV I, PEDROSA FO (2000) Role of PII protein as a signal nitrogen level. In: Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G., Newton, W.E., (Eds.), Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.105-106.

BENELLI EM, SOUZA EM, FUNAYAMA S, RIGO LU and PEDROSA FO (1997) Evidence for Two Possible *glnB*-Type Genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Bacteriol.*, v.179, no.14, p.4623-4626.

BERLETT BS, LEVINE RL, STADTMAN ER (1998) Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.2784-2789.

BLOOM FR, LEVIN MS, FOOR F and TYLER B (1978) Regulation of glutamine synthetase formation in *Escherichia coli*: characterization of mutants lacking the uridylyltransferase. *J. Bacteriol.*, v.134, p.569-577.

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

BROWN M S, SEGAL A AND STADTMAN ER (1971) Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by metabolic transformation of the P II -regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.68, p.2949-2953.

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



BURBULYS D, TRACH KA and HOCH JA (1991) The initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, v.64, p.545-552.

CABAN CE and GINSBURG A (1976) Glutamine synthetase adenylyltransferase from *Escherichia coli*: purification and physical and chemical properties. *Biochemistry*, v.15, p.1569-1580.

CHIPMAN DM, SHAANAN B (2001) The ACT domain family. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.11, no.6, p.694-700.

CHOCK PB and STADTMAN ER (1977) Superiority of interconvertible enzyme cascades in metabolic regulation: analysis of multicyclic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.74, p.2766-2770.

CHUNG HK, RHEE SG (1984) Separation of glutamine synthetase species with different states of adenylylation by chromatography on monoclonal anti-AMP antibody affinity columns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.81, p.4677-4681.

COLNAGHI R, RUDNICK P, HE L, GREEN A, YAN D, LARSON E and KENNEDY C (2001) Lethality of *glnD* null mutations in *Azotobacter vinelandii* is suppressible by prevention of glutamine synthetase adenylylation. *Microbiology*, v.47, p.1267-1276.

CONTRERAS A, DRUMMOND M, BALI A, BLANCO G, GARCIA E, BUSH G, KENNEDY C, MERRICK M (1991) The Product of the Nitrogen Regulatory Gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is Functionally and Structurally Homologous to the Uridyltransferase Encoded by *glnD* in Enteric Bacteria. *J. Bacteriol.*,v.173, no.24, p.7741-7749.

CRUZ LM, SOUZA EM, WEBER OB, BALDANI JI, DÖBEREINER J and PEDROSA FO (2001) 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). *Appl Environ Microbiol.*, v.67, no.5, p.2375-2379.

de MEL VSJ, KAMBEROV ES, MARTIN PD, ZHANG J, NINFA AJ, EDWARDS BFP (1994) Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, v.243, p.796-798.

DEAN RD, BOLIN JT, ZHENG L (1993) Nitrogenase metallocluster: structure, organization and synthesis. *J. Bacteriol.*, v.175, p.6737.

DING L and YOKOTA A (2004) Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.54, p.2223-2230.

DIXON, R AND KAHN, D (2004) Genetic regulation of nitrogen fixation. *Nature Rev. Micro.* V.2, p.621-631.

DÖBEREINER J (1992) Recent changes in concepts of plant bacteria interactions. Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Ciência e Cultura*, v.44, p.310-313.

DÖBEREINER J, DAY JM (1975) Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In *International Symposium On Nitrogen Fixation*, vol.1 (W.E. Newton and C.J. Nyman, Eds), p.518-538, Pullman Proceedings Washington, Washington State University.

EINSLE O, TEZCAN FA, ANDRADE SL, SCHMID B, YOSHIDA M, HOWARD JB, REES DC (2002) Nitrogenase MoFe-protein at 1.6Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. *Science*, v.297, p.1696-1700.

ELBELTAGY A, NISHIOKI K, SATO K, SUZUKI T, YE H, HAMADA B, ISAWA T, MITSUI T, MINAMISAWA K (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, p.5285-5293.

ENGLEMAN and FRANCIS (1978) Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.191, p. 602-612.

ESPIN G, MORENO S, WILD M, MEZA R, LACCARINO M (1990) A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.*, v.223, p.513-516.

FADEL-PICHETH CM, SOUZA EM, RIGO LU, FUNAYAMA S, YATES MG, PEDROSA FO (1999) Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. *FEMS Microbiol Lett.*, v.179, p.281-288.

FALK EC, JOHNSON JL, BALDANI VLD, DÖBEREINER J, KRIEG NR (1986) Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.36, p.80-85.

FARNHAM PJ, PLATT T (1981) Rho-independent termination: dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, v.9, p.563-577.

FENG J, ATKINSON MR, McCLEARY W, STOCK JB, WANNER BL, NINFA AJ (1992) Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, v.174, n.19, p.6061-6070.

FERREIRA AC, COZZOLINO K, CARVALHO ARV, DÖBEREINER J (1995) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In

*International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – The Role of Biological Nitrogen Fixation*, p.20. Angra dos Reis, Rio de Janeiro.

FOOR F, CEDERGREN RJ, STREICHER SL, RHEE SG and MAGASANIK B (1978) Glutamine synthetase of *Klebsiella aerogenes*: properties of *glnD* mutants lacking uridylyltransferase. *J. Bacteriol.*, v.134, p.562-568.

FOOR F, JANSSEN K and MAGASANIK B (1975) Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.72, p.4844-4848.

FORCHHAMMER K, HEDLER A, STROBEL H, WEISS V (1999) Heterotrimerization of PII-like signalling proteins: implications for PII-mediated signal transduction systems. *Mol. Microbiol.*, v.33, p.338-349.

FORCHHAMMER K, TANDEAU de MARSAC, N (1994) The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-Status. *J. Bacteriol.* v.176-1, p.84-91.

FRANCIS SH and ENGLEMAN EG (1978) Cascade Control of *E. coli* Glutamine Synthetase I. Studies on the Uridylyl Transferase and Uridylyl removing Enzyme(s) from *E. coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* v.191, p.590-601.

FU H and BURRIS RH (1989) Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. bacteriol.*, v.171, p.3168-3175.

GARCIA E and RHEE SG (1983) Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme. *J. Biol. Chem.* v.258, p.2246-2253.

GARCIA E, FEDERICI M, RHEE SG and BERBERICH (1980) Glutamine Synthetase Cascade: Enrichment of Uridylyltransferase in *Escherichia coli* Carrying Hybrid ColE1 Plasmids. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.203, p.181-189.

GIVAN CV (1979) Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry*, v.18, p.375-382.

GOLDENBERG DP (1989) Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. In: T.E Creighton, Editor, *Protein Structure, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, p.225–250.

GOTTESMAN S, WICKNER S and MAURIZI MR (1997) Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev*, v.11, p. 815–823.

GRAF J, RUBY EG (2000) Novel effects of a transposon insertion in the *Vibrio fischeri glnD* gene: defects in iron uptake and symbiotic persistence in addition to nitrogen utilization. *Mol Microbiol*, v.37, p.168-179.

GRAHAM PH and VANCE CP (2000) Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, v.65, p.93-106.

GYANESHWAR P, JAMES EK, REDDY PM, REINHOLD-HUREK B and LADHA JK (2002) *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminum tolerant rice varieties. *New phytol.*, v.154, p.131-146.

HAGEMAN RV and BURRIS RH (1978) Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.75, p.2699-2702.

HARDY RWF and HAVELKA VP (1975) Nitrogen fixation research: a key to world food. *Science*, v.188, p.633-643.

HESKETH A, FINK D, GUST B, REXER HU, SCHEEL B, CHATER K, WOHLLEBEN W and ENGELS A (2002) The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen

regulatory system counterparts from enteric bacteria. *Mol. Microbiol.*, v.2, p.319-330.

HOLM L, SANDER C (1995) DNA polymerase  $\beta$  belongs to an ancient nucleotidyltransferase superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, v.20, p.345-347.

HOWARD JB and REES DC (1996) Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem. Rev.*, v.96, p.2965-2982.

HOWARTH R, ANDERSON D, CLOERN J, ELFRING C, HOPKINSON C, LAPOINTE B, MALONE T, MARCUS N, MCGLATHERY K, SHARPLEY A, WALKER D (2000) Nutrient Pollution of Coastal Rivers, Bays, and Seas. *Issues in Ecology*. v.7, p.2-15.

HSIEH M, LAM H, VANDELOO FJ, CORUZZI G (1998) A PII-Like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.13965-13970.

HUBER HE, BEAUCHAMP BB, RICHARDSON CC (1998) *Escherichia coli* dGTP triphosphohydrolase is inhibited by gene 1.2 protein of bacteriophage T7. *J Biol Chem* v.263, p.13549-13556.

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

IM WT, BAE HS, YOKOTA A and LEE ST (2004) *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium *Int .J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.54, p.851-855.

JAGGI R, van HEESWIJK WC, WESTERHOF HV, OLLIS DL and VASUDEVAN SG (1997) The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains with intra-molecular signal transduction. *EMBO J.*, v.16, p.5562-5571.

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

JAMES EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Res.*, v.65, p.197-209.

JAMES EK, GYANESHWAR P, MATHAN N, BARRAQUIO WL, REDDY PM, IANNETTA PPM, OLIVARES FL, LADHA JK (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, v.15, p.894-906.

JAMES EK, OLIVARES FJ, BALDANI JI, DÖBEREINER J (1997) *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *J. Exp. Bot.* v.48, p.785-797.

JAMES EK, OLIVARES FL (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.17, p.77-119.

JIANG P, PELISKA JA and NINFA AJ (1998a) The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-cetoglutarate in the regulation of the glutamine synthetase adenylation state. *Biochemistry*, v.37, p.12802-12810.

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

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

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

KAMBEROV ES, ATKINSON MR, FENG J, CHANDRAN P and NINFA AJ (1994a) Sensory components controlling bacterial nitrogen fixation. *Cell Mol. Biol. Res.*, v.40, p.175-191.

KAMBEROV ES ATKINSON MR, FENG J, CHANDRAN P, NINFA AJ (1994b) Effect of mutation in *E. coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the fosfatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. *J. Biol. Chem.*, v.269, p.28294-28299.

KAMBEROV ES, ATKINSON MR and NINFA AJ (1995) The *Escherichia coli* signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.17797-17807.

KAMMEN HO, MARVEL CC, HARDY L AND PENHOET EE (1988) Purification, structure, and properties of *Escherichia coli* tRNA pseudouridine synthase I. *J. Biol. Chem.*, v.263, p.2255-2263.

KIRCHHOF G, ECKERT B, STOFFELS M, BALDANI JI, REIS VM, HARTMANN A (2001) *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.51, p.157-168.

KLASSEN G, PEDROSA FO, SOUZA EM, FUNAYAMA S and RIGO LU (1997) Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Can. J. Microbiol.*, v.43, p.887-891.



KLASSEN G, PEDROSA FO, SOUZA EM, YATES MG, RIGO LU (1999) Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.181, p.165-170.

KLOEPPER JW, SCHOONERS B and BAKER PAHM (1992) Proposed elimination of the term *Endorhizosphere*. *Phytopathology*, v.82, p.726-727.

LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. *Nature*, v.227, p. 680–685.

LEE SY (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. and Bioengineering*, v.49, p.1-14.

LIAO HH (1991) Effect of temperature on the expression of wild-type and thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.*, v.2, no.1, p.43-50.

LIU J, MAGASANIK B (1993) The *glnB* region of the *Escherichia coli* chromosome *J. Bacteriol.*, v.175, p.7441-7449.

MACHADO IMP, YATES MG, MACHADO HB, SOUZA EM E PEDROSA FO (1996). Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.29, p. 1599-1602.

MAGALHÃES CRUZ L, de SOUZA EM, WEBER OB, BALDANI JI, DÖBEREINER J, PEDROSA FO (2001) 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril) *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, no. 5, p.2375-2379.

MANGUM JH, MAGNI G and STADTMAN ER (1973) Regulation of Glutamine Synthetase Adenylation and Deadenylation by Enzymatic Uridylylation and Deuridylylation of the PII Regulatory Protein. *Arch. Of Biochem. and Biophysics*. v.158, p.514-525.

McCLEARY W, STOCK JB and NINFA AJ (1993) Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* v.175, p.2793-2798.

MERRICK MJ (1988) Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In BOTHE H, de BRUIJN FJ, NEWTON WE (Eds.). Nitrogen Fixation: hundred years after. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, p.293-302.

MERRICK MJ, EDWARDS RA (1995) Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiol. Rev.*, v.59, p.604-622.

MONTEIRO RA, SOUZA EM, STEFFENS MBR, PEDROSA FO, YATES MG, RIGO LU (2000) Use of lactose to induce expression of soluble NifA protein domains of *Herbaspirillum seropedicae* in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, v.46, p.1087-1090.

NINFA AJ and BENNETT RL (1991) Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein kinase/phosphatase NR<sub>II</sub>. *J. Biol. Chem.*, v.266, p.6888-6893.

NINFA AJ, JIANG P, ATKINSON MR, PELISKA JA (2000) Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Curr. Top. Cell Regul.*, v.36, p.31-75.

NINFA AJ, MAGASANIK B (1986) covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NR<sub>II</sub>, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.83, p.5909-5913.

NOINDORF L (2002) Clonagem, seqüenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Universidade Federal do Paraná, 105p., Tese de Mestrado.

O'CONNELL RP, RAFFEL SJ, SAVILLE BJ and HANDELSMAN J (1998) Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induces chlorosis in plants. *Microbiology*, v.144, p.2607-2617.

OLIVARES FL, BALDANI VLD, REIS VM, BALDANI JI, DÖBEREINER J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils*, v. 21, p.197-200.

PEDROSA FO, BENELLI EM, YATES MG, WASSEM R, MONTEIRO RA, KLASSEN G, STEFFENS MB, SOUZA EM, CHUBATSU LS, RIGO LU (2001) Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *J Biotechnol.*, v.91, p.189-195.

PERLOVA O, NAWROTH R, ZELLERMANN EM, MELETZUS D (2002) Isolation and characterization of the *glnD* gene of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, encoding a putative uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme. *Gene*, v. 297 (1-2), p.159-168.

PLAYER MR and TORRENCE PF (1999) The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol. Ther.*, v.78, p.55-113.

POSTGATE JR (1982) The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge: Cambridge Univ. Press.

RAMOS HJ, RONCATO-MACCARI LD, SOUZA EM, SOARES-RAMOS JR, HUNGRIA M, PEDROSA FO (2002) Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *J Biotechnol.* v.28, no.3, p.243-252.

RHEE SG, CHOCK PB and STADTMAN ER (1985) Glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, v.113, p.213-241.

RICHAUD C, RICHAUD F, MARTIN C, HAZIZA C, PATTE JC (1984) Regulation of expression and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *dapD* gene. *J Biol Chem.*, v. 259, no.23, p.14824-14828.

RODERICK SL, MATTHEWS BW (1988). Crystallization of methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, v.15, no.32, p.16531.

RONCATO-MACCARI LDB, RAMOS HJO, PEDROSA FO, ALQUINI Y, CHUBATSU LS, YATES MG, RIGO LU, STEFFENS MBR, SOUZA EM (2003) Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. *Symbiosis*, v.35, p.261-270.

ROSENBERG AH, LADE BN, CHUI DS, LIN SW, DUNN JJ, STUDIER FW (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, v.56, p.125-135.

RUDNICK P, ARCONDÉGUY T, KENNEDY C, KAHN D (2001) *glnD* an *mviN* are genes of an Essential Operon in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, v.183, no.8, p.2682-2685.

RUDNICK P, KUNZ C, GUNATILAKA MK, HINES ER, KENNEDY C (2002) Role of GlnK in NifL-mediated regulation of NifA activity in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, v.174, no.3, p.812-820.

SAMBROOK EFF and MANIATIS T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (second ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

SANSON RK, COUTO GH, WASSEM R, SOUZA EM, PEDROSA FO. Mutagenesis and Functional Analysis of *glnD* mutants *Herbaspirillum seropedicae*. In: XXXIII Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2004, Caxambú (MG).

SCHÜLLER DJ, GRANT GA, BANASZAK LJ (1995) The allosteric ligand site in the Vmax-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.*, v.2, no.1, p.69-76.

SCHÜLTER A, NÖHLEN M, KRÄMER M, DEFEZ R, PRIEFER U (2000) 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.

SCHULTZ J, COPLEY RR, DOERKS T, PONTING CP and BORK P (2000) SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res*, v.28, p. 231-234.

SHAPIRO BM, KINGDON HS and STADTMAN ER (1967) Regulation of glutamine synthetase.8.ATP: glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.58, p.642-649.

SHATTERS RG, LIU Y, KAHN ML (1993) Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.*, v.268, p.469-475.

SILVA LG, MIGUENS, OLIVARES FL (2003) *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. *Braz. J. Microbiol.* v.34, p.69-71.

SIMPSON FB, BURRIS RH (1984) A nitrogen pressure of 50 atmosferes does not prevent evolution of hidrogen by nitrogenase. *Science*, v.224, p.1095-1096.

SMITH BE, EADY RR (1992) Metallocluster of the nitrogenases. *Eur. J. Biochem.*, v.205, p.1-15.

SON HS, RHEE SG (1987) Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. *J. Biol. Chem.*, v.262, p.8690-8695.

SOUZA EM, FUNAYAMA S, RIGO LU, PEDROSA FO (1991a) Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *Can. J. Microbiol.*, v.37, p.425-429.

SOUZA EM, FUNAYAMA S, RIGO LU, YATES MG, PEDROSA FO (1991b) Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J. Gen. Microbiol.*, v.137, p.1511-1522.

SOUZA EM, FUNAYAMA S, RIGO LU, YATES MG, PEDROSA FO (1991b) Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J Gen Microbiol.*, v.137, no.7, p.1511-1522.

SOUZA EM, PEDROSA FO, DRUMMOND M, RIGO LU, YATES MG (1999) Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. *J Bacteriol.*, v.181, p.681-684.

SOUZA EM, PEDROSA FO, RIGO LU, MACHADO HB, YATES MG (2000) Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. *Microbiology*, v.146, p.1407-1418.

STADTMAN ER, HOHMAN RJ, DAVIS JN, WITTENBERG M, CHOCK PB, RHEE SG (1980) Subunit interaction of adenylylated glutamine synthetase. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, v.32, p.144-156.

SUN J, van DOMMELEN A, IMPE JV and VANDERLEYDEN J (2002) Involvement of *glnB*, *glnZ*, and *glnD* Genes in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, no.2, p.985-988.

TAL S and OKONY (1985) Production of the reserve material polyhydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.*, v.31, p.608-613.

TSUMOTO K, EJIMA D, KUMAGAI I and ARAKAWA T (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, v.28, p.1-8.

VALVERDE A, VELÁZQUEZ E, GUTIÉRREZ C, CERVANTES E, VENTOSA A and IGUAL JM (2003) *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.53, p.1979-1983.

van DOMMELEN A, KEIJERS V, SOMERS E and VANDERLEYDEN J (2002) Cloning and characterization of the *Azospirillum brasilense* *glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. *Mol. Gen. Genomics*, v. 266, no.5, p. 813-820.

van HEESWIJK WC, HOVING S, MOLENAAR D, STEGEMAN B, KAHN D and WESTERHOFF HV (1996) An alternative P<sub>II</sub> protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, v.21, p.133-146.

van HEESWIJK WC, STEGEMAN B, HOVING S, MOLENAAR D, KAHN D, WESTERHOFF HV (1995) An additional P<sub>II</sub> in *Escherichia coli*: a new regulatory protein in the glutamate synthetase cascade. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.132, p.153-157.

van HEESWIJK WC, WEN D, CLANCY P, JAGGI R, OLLIS DL, WESTERHOFF HV and VASUDEVAN SG (2000) The *Escherichia coli* signal transducers P<sub>II</sub> (GlnB) and GlnK form heterodimers *in vivo*: fine tuning the nitrogen signal cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.97, p.3942-3947.

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

WASSEM R, PEDROSA FO, YATES MG, REGO FG, CHUBATSU LS, RIGOLU, SOUZA EM (2002) Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. *FEMS Microbiol Lett.*, v.212, p.177-182.

WASSEM R, SOUZA EM, YATES MG, PEDROSA FO and BUCK M (2000) Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. *Molecular Microbiol.*, v.35, Issue 4, p. 756-764.

WEBER OB, BALDANI VLD, TEIXEIRA K S, KIRCHHOF G, BALDANI J I and DÖBEREINER J (1999) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants. *Plant Soil*, v. 210, p.103-113.

WEISS DS, BATUT J, KLOSE KE, KEENER J, KUSTU S (1991) 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.

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

WESTERMEIER R, NAVEN T. Part II: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. In WESTERMEIER R, NAVEN T (ED.) **Proteomics in Practice. A laborator Manual of Proteome Analysis**. WILEY-VCH, 2004, p.261.

WILLIAMS LE, MILLER AJ (2001) Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, v.52, p.659-688.



WOOLFOLK CA and STADTMAN ER (1967) Regulation of glutamine synthetase. III. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.118, p.736-755.

WRZESINSKI J, NURSE K, BAKIN A, LANE BG and OFENGAND J (1995) A dual-specificity pseudouridine synthase: an *Escherichia coli* synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA(phe). *RNA*, v.1, p.437-448.

XU Y, CHEAH E, CARR PD, VAN HEESWIJK WC, WESTERHOFF HV, VASUDEVAN SG and OLLIS DL (1998) GlnK, a PII-homologue: Structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. *J. Mol. Biol.*, v.282, p.149-165.

YOUNG JPW (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In STACEY G, BURRIS RH, EVANS HJ (eds). *Biological Nitrogen Fixation*. London: Chapman e Hall, New York, p.43-86.

ZHANG Y, BURRIS RH, LUDDEN PW, ROBERTS GP (1993) Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, v.175, p.6781-6788.

ZHANG Y, BURRIS RH, ROBERTS GP (1992) Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, v.174, p.3364-3369.

ZHOU MY, GOMEZ-SANCHEZ CE (2000) Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol*. v.2, no.1, p.1-7.