

KERLY LASKOSKI

**CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS NAD SINTETASES (NadE1 e
NadE2) DE *Herbaspirillum seropedicae***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientadores: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo e Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Dr. Luciano Fernandes Huergo pela presença constante, atenção e incentivo, além do exemplo de dedicação e motivação.

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza, que também me incentivou e pelas palavras de apoio. Também pelas idéias que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra Ana Cláudia Bonatto, que idealizou o projeto e iniciou os trabalhos que resultaram nesta dissertação. Também por ter ajudado a purificar as PII, quando eu ainda fazia iniciação científica e por fornecer as pII uridililadas para os ensaios de cinética enzimática.

Ao Dr. David Michael pelas aulas de cinética enzimática e também pelas discussões esclarecedoras.

Aos professores do departamento de bioquímica que ministraram as disciplinas por mim frequentadas durante o mestrado, que também foram importantes para minha formação.

À Dona Jú, à Dona Roseli e ao Valter, pelo trabalho e atenção dispensados.

À coordenação da Pós-graduação, pelo trabalho burocrático, pelas gentilezas e orientações.

Ao Marco K. e Dr. Marcelo Muller pelas dicas de purificação.

Ao Arnaldo pelos truques no uso do Excel, essenciais nas análises cinéticas.

Aos amigos, colegas e demais integrantes do laboratório pela troca de experiências e apoio.

E as agências financiadoras, FINEP, MCT, CNPq, PRONEX, Instituto do Milênio, CAPES, SETI/Paraná, FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA e CABBio.

RESUMO

As enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo sintetase (NadE) catalisam o último passo da biossíntese do cofator NAD utilizando como substratos o ATP, o ácido nicotínico adenina dinucleotídeo (NaAD) e uma fonte doadora de grupamento amino, que pode ser a glutamina ou a amônia. O interesse nessa enzima surgiu com a hipótese de uma possível relação funcional entre NadE1 e a proteína transdutora de sinal GlnB devido à conservação filogenética da proximidade física entre os genes que codificam estas proteínas. Em *Herbaspirillum seropedicae* o gene *nadE1* encontra-se a montante do gene *glnB*. Em *H. seropedicae* foi identificado um gene homólogo a *nadE1*, denominado de *nadE2*. Os genes *nadE1* e *nadE2* foram amplificados por PCR e clonados no vetor pET28a; versões contendo uma fusão de 6 histidinas na porção N-terminal de NadE1 e de NadE2 foram superexpressas em *Escherichia coli* e purificadas através de cromatografia de afinidade usando a resina Hi-trap chelating. As proteínas purificadas foram utilizadas em ensaios de atividade enzimática *in vitro*. A síntese de NAD foi monitorada indiretamente adicionando a enzima álcool desidrogenase ao sistema para reduzir o NAD a NADH, que pode ser quantificado por espectrofotometria. A enzima NadE2 não apresentou atividade *in vitro*. NadE1 apresentou atividade específica de 1756 mU/mg e 600 mU/mg usando como fonte de grupo amino a amônia e a glutamina, respectivamente. Foram determinadas as constantes de Michaelis para os substratos ATP, glutamina, amônia e o NaAD. Os dados obtidos sugerem que NadE1 utiliza preferencialmente glutamina como fonte de grupos amino. A presença da proteína GlnB uridililada ou desuridililada ao sistema de reação não alterou a atividade de NadE1.

ABSTRACT

The enzymes nicotinamide adenine dinucleotide synthetases (NadE) catalyse the last step of the NAD cofactor biosynthesis using ATP, Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide (NaAD) and a source of amine group as substrates, which can be Glutamine or Ammonium. The phylogenetic conservation of NadE1 and the signal transducer GlnB coding genes arouse the hypothesis of functional relationship between these proteins. In *Herbaspirillum seropedicae* *nadE1* gene is upstream *glnB* gene. A homologous gene of *nadE1*, called *nadE2*, was found in *Herbaspirillum seropedicae*. Both genes were PCR amplified and cloned on pET28-a vector; versions attaching six histidines tagged on N-terminal domains of NadE1 and NadE2 were expressed and purified through affinity chromatography on Hi-trap chelating column. Enzymatic activities of the purified proteins were assayed *in vitro*. NAD synthesis was indirectly detected adding Alcohol Dehydrogenase to reduce NAD to NADH, which can be measured spectrophotometrically. NadE2 enzyme did not show *in vitro* activity. The specific activities of NadE1 were 1756 mU/mg and 600 mU/mg using Ammonium and Glutamine as amine sources, respectively. Michaelis-Menten constants for NadE1 substrates NaAD, ATP, Glutamine and Ammonium were determined. Present results suggest that NadE1 preferentially uses Glutamine as amine source. Presence of GlnB on reaction system did not modify NadE1 activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> E A IMPORTÂNCIA DE BIOFERTILIZANTES	11
2.2. AS PROTEÍNAS PII.....	12
2.3. GLNB E O SISTEMA NTR	13
2.4. ENZIMAS NAD SINTETASES	14
2.5. AS VIAS BIOSSÍNTÉTICAS DO NAD.....	21
2.5.1. <i>Via de novo</i>	23
2.5.2. <i>Ramo comum</i>	23
2.5.3. <i>Vias de reciclagem</i>	23
2.5.4. <i>Regulação transcricional da via de novo e de reciclagem</i>	24
2.6. RE-SÍNTESE DE NAD E A INFLUÊNCIA DO OXIGÊNIO.....	25
2.7. O NAD COMO SINALIZADOR CELULAR	25
2.8. PREVISÃO DE INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA POR ANÁLISE GENÔMICA	26
3. JUSTIFICATIVA.....	29
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. OBJETIVOS GERAIS.....	29
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	31
5.2. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	31
5.3. ANTIBIÓTICOS	33
5.4. MANIPULAÇÕES DE DNA.....	33
5.4.1. <i>Amplificação através da reação em cadeia da enzima DNA polimerase</i>	33
5.4.2. <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	34
5.4.3. <i>Clivagem do DNA com enzimas de restrição</i>	34
5.4.4. <i>Reação de ligação</i>	34
5.4.5. <i>Reação de seqüenciamento</i>	35
5.4.6. <i>Preparo de células eletrocompetentes</i>	36
5.4.7. <i>Transformação bacteriana por eletroporação</i>	36

5.4.8	<i>Purificação de DNA plasmidial</i>	36
5.5	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	37
5.5.1	<i>Expressão e lise protéica</i>	37
5.5.2	<i>Purificação de proteínas</i>	38
5.5.3	<i>Eletroforese SDS-PAGE</i>	38
5.5.4	<i>Dosagem de proteínas</i>	39
5.6	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR MALDI-TOF/MS.....	39
5.7	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	40
5.7.1	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	40
5.7.2	<i>Estudos de cinética enzimática</i>	40
5.7.3	<i>Determinação da velocidade inicial</i>	41
5.8	CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO.....	41
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1.	PURIFICAÇÃO DE NADE1	43
6.2.	CLONAGEM DE <i>nadE2</i>	43
6.3.	PURIFICAÇÃO DE NADE2	45
6.4.	GEL FILTRAÇÃO	47
6.5.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	50
6.5.1.	<i>Curva padrão</i>	50
6.5.2.	<i>Concentração de ADH como fator limitante na determinação da atividade de NadE1</i>	51
6.5.3.	<i>Efeito do DTT na atividade de NadE1</i>	53
6.5.4.	<i>Efeito da proteína GlnB sobre a atividade de NadE1</i>	54
6.5.5.	<i>Cinética</i>	55
6.6.	ANÁLISES DE SEQUÊNCIA	65
7.	CONCLUSÕES	73
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regiões de consenso do sítio ativo da região amidohidrolase das NAD sintetases dependentes de glutamina em procariotos.....	15
Figura 2 – Estrutura da NAD sintetase dependente de glutamina de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
Figura 3 – Seqüência de aminoácidos da NAD sintetase de <i>M. tuberculosis</i>	20
Figura 4 - Vias biossintéticas do NAD.	22
Figura 5 - Cladograma destacando alguns organismos com genes <i>nadE</i> próximos a genes <i>glnB</i>	27
Figura 6 – Perfil eletroforético da purificação de <i>NadE1</i> em SDS-PAGE 10%, corado com Comassie blue R-250.....	43
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, contendo o produto de amplificação do gene <i>nadE2</i> de <i>H. seropedicae</i>	44
Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, contendo os fragmentos de restrição de <i>pETNADE2</i> digerido com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i>	45
Figura 9 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% da eluição de <i>NadE2</i>	46
Figura 10 - Espectro de <i>NadE2</i> tripsinizada obtido por MALDI-TOF ao lado das listas de picos monoisotópicos gerados pelo programa <i>flexAnalysis</i>	46
Figura 11 – Gel filtração de <i>NadE1</i> e de <i>NadE2</i> em Superose 6 em sistema AKTA-FPLC.....	48
Figura 12 – Perfil de eluição de <i>NadE2</i> em purificação de Gel Permeação realizada em sistema AKTA-FPLC	49
Figura 13 – Perfil de eluição de <i>NadE1</i> em Gel Permeação realizada em sistema AKTA-FPLC.	49
Figura 14 – Curva padrão de NADH.	51
Figura 15 – Limitação de ADH na determinação da velocidade inicial de <i>NadE1</i> . ..	52
Figura 16 – Velocidade inicial de <i>NadE1</i> em função da quantidade de enzima. ...	53
Figura 17 – Efeito de <i>GlnB</i> sobre a atividade de <i>NadE1</i>	55
Figura 18 – Gráficos cinéticos utilizando como substrato o ATP.....	59
Figura 19 – Gráficos cinéticos utilizando como substrato a glutamina.	60
Figura 20 – Gráficos cinéticos utilizando como substrato a amônia.....	61
Figura 21 – Gráficos cinéticos utilizando como substrato o NaAD.	62
Figura 22 – Alinhamento entre as NAD sintetases de <i>M. tuberculosis</i> , <i>H. seropediceae</i> (<i>NadE1</i> e <i>NadE2</i>), <i>T. maritima</i> e <i>S. cerevisiae</i>	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS	31
TABELA 2 – MEIO NFB-MALATO	32
TABELA 4 – MEIO SOB.....	32
TABELA 5 – MEIO LB	33
TABELA 6 - ANTIBIÓTICOS	33
TABELA 7 – EFEITO DO DITIOITREITOL NA ATIVIDADE DE NadE1.....	53
TABELA 8 – CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES DE NAD SINTETASES DEPENDENTES DE GLUTAMINA USANDO COMO SUBSTRATOS O ATP, O NaAD, A GLUTAMINA E A AMÔNIA	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH	Álcool desidrogenase
ADP	5' difosfato de adenosina
AMP	5' monofosfato de adenosina
ATP	5' trifosfato de adenosina
D.O.	Densidade óptica
D.O. ₆₀₀	Densidade óptica em 600 nanômetros
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético
GlnB-U	Proteína GlnB uridililada
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
K _{av}	Coeficiente de partição
kDa	Quilodalton
km	Canamicina
K _M	Constante de Michaelis-Menten; para os substratos de NadE esta abreviatura indica o K _M aparente.
L	Litro
MALDI-TOF	O inglês: “ <i>matrix assisted laser desorption ionization - time of light</i> ” (Ionização desaborção a laser assistida por matriz - tempo de voo)
MW	Massa molecular
NaAD	Ácido nicotínico adenina dinucleotídeo
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotideo oxidado; NAD ⁺
NadA	Quinolato sintase
NadB	L-aspartato oxidase
NadC	Ácido quinólico fosforribosiltransferase
NadD	Ácido nicotínico mononucleotídeo adenililtransferase
NadE	NAD sintetase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NadR	Nicotinamida ribonucleosídeo quinase e nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase

NadV	Nicotinamida fosforribosiltransferase
NaMN	Ácido nicotínico mononucleotídeo
nm	Nanômetro
NMN	Nicotinamida mononucleotídeo
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PncA	Nicotinamida deamidase
PncB	Ácido nicotínico fosforribosiltransferase
PncC	Nicotinamida fosforribosiltransferase
PPi	Pirofosfato inorgânico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
S ₁	Subunidade 1
S ₅	Subunidade 5
S ₀	Concentração inicial de substrato
Sm	Estreptomina
TEMED	N,n-tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	Unidade de atividade enzimática, dada pela quantidade de proteína capaz de produzir um micromol de produto em um minuto
V	Volt
V _{max}	Velocidade máxima
V ₀	Velocidade inicial

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a atividade das proteínas NADsintetases (NadE1 e NadE2) e determinar sua relação funcional com a proteína transdutora de sinal GlnB em *Herbaspirillum seropedicae*.

H. seropedicae vem sendo estudada pelo núcleo de fixação de nitrogênio da Universidade Federal do Paraná por ser um diazotrofo com potencial biotecnológico. O seqüenciamento do genoma deste organismo foi recentemente concluído e a caracterização funcional dos genes identificados constitui a etapa subsequente ao seqüenciamento.

A proteína GlnB faz parte da família PII. Ela é uma proteína reguladora central do metabolismo amplamente estudada em diversos organismos. Dentre as funções já caracterizadas desta proteína estão a sinalização dos níveis de energia, carbono e nitrogênio fixado.

Proteínas NAD sintetases (NadE) codificam proteínas responsáveis pela catálise do último passo da biossíntese de NAD. A biossíntese deste cofator pode ocorrer por uma via *de novo* e a partir de vias de reciclagem, sendo que estas vias podem convergir para um ramo comum, do qual NadE catalisa a última etapa. O gene *nadE1* é encontrado no genoma de *H. seropedicae* próximo ao gene que codifica a proteína GlnB. Esta proximidade é conservada em vários organismos distantes evolutivamente sugerindo uma relação funcional ainda não identificada entre estas proteínas. Normalmente, a conservação da proximidade filogenética implica em enzimas que participam da mesma via metabólica ou atividade regulatória com interação proteína-proteína.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Herbaspirillum seropedicae* E A IMPORTÂNCIA DE BIOFERTILIZANTES

Herbaspirillum seropedicae foi isolada em 1986 na cidade de Seropedica-RJ (BALDANI et al., 1986). Desde então ela vem sendo estudada principalmente devido a

sua capacidade de fixar nitrogênio e de associar-se a vegetais como alternativa econômica e ecológica ao uso de fertilizantes nitrogenados.

Herbaspirillum seropedicae associa-se endofiticamente à gramíneas de interesse agrônomo, como cana-de-açúcar, sorgo e milho (BALDANI et al., 1986), aumentando a produtividade destas culturas e, portanto, tem uso potencial como alternativa aos fertilizantes nitrogenados, que são fertilizante caros e causadores de eutrofização de mananciais (YU'E e ERDA, 2000).

Diferentemente das bactérias do gênero *Rhizobium*, *H. seropedicae* não forma nódulos nas raízes das plantas com as quais se associa. A bactéria distribui-se pelos tecidos vegetais como raiz, partes aéreas e pelos vasos condutores (BEATTIE, 2007)

Em condições limitantes de nitrogênio, plantas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram aumento na biomassa quando comparado a plantas cultivadas com fertilizante nitrogenado inorgânico (GOVINDARAJAN, 2006).

Estudos com nitrogênio marcado indicam que o nitrogênio fixado por bactérias diazotróficas é incorporado pelos vegetais associados (BEATTIE, 2007). Em *H. seropedicae*, no entanto, o estímulo ao crescimento vegetal possivelmente ocorre devido a fitormônios produzidos pelo microorganismo (WANG, 2005).

2.2. AS PROTEÍNAS PII

A família PII compreende um grupo de proteínas bastante conservadas em procaríotos com papel central no metabolismo de nitrogênio (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001).

Até recentemente, as PII eram divididas em três grupos de acordo com o contexto genômico e por similaridade de sequências de aminoácidos. Foram classificados como GlnB proteínas cujos genes eram monocistrônicos ou ligados aos genes *glnA* ou *nadE*. Em outro grupo, GlnK foram classificadas proteínas cujos genes são co-transcritos com o gene *amtB*. O terceiro grupo, denominado NifL são proteínas cujos genes estão localizados próximos aos genes *nif* em Archeas (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001)

No entanto, foram descritas inúmeras PII que não se enquadravam nesta classificação. Sant'ana et al. analisaram seqüências nucleotídicas de PII de Bacteria e

de Archaea e propuseram uma nova classificação. A definição antiga para GlnK, GlnB e Nifl foi basicamente mantida, mas foram propostos quatro subgrupos para GlnK: ARC, composto por GlnK de Archaea, ACT, que inclui GlnK de Actinobacteria, DIV, composto por GlnK de procariotos diversos e CYA, que contem GlnK de Cyanobacteria e de Plantae. Em Proteobactéria, a proteína GlnB ficou no mesmo grupo que a proteína GlnK: GlnK/B. Ainda nesta classificação foi adicionado um novo grupo que contém PII cujos genes estão próximos a genes de proteínas responsáveis pelo metabolismo de metais pesados (SCHRANK et al., 2009).

2.3. GLNB E O SISTEMA NTR

Em enterobactéria o sistema ntr regula o metabolismo de nitrogênio tendo como peças centrais as proteínas PII (GlnB e GlnK). Este sistema tem como componentes as proteínas PII, GlnD, NtrB e NtrC. Dependendo dos níveis de nitrogênio, carbono ou de energia, as proteínas PII podem ser covalentemente modificadas pela ligação de um grupamento uridilil, pela ação da enzima GlnD, ou uridilil transferase; baixas concentrações de nitrogênio fixado, detectado na forma de glutamina, e alta disponibilidade de carbono (2-oxoglutarato) e de energia (ATP), propiciam as condições para a uridililação das PII (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001).

O estado de uridilação das PII, por outro lado, governa uma série de respostas, como assimilação de amônia, pela glutamina sintetase e a expressão de genes relacionados com o metabolismo de nitrogênio. Em baixas concentrações de nitrogênio a atividade da glutamina sintetase (GS) é ativada; nestas condições, a uridililação das PII promove a remoção de um grupamento adenilil presente na glutamina sintetase por intermédio da adenililtransferase ativando a GS. As proteínas NtrB/NtrC funcionam como um sistema de dois componentes, no qual a primeira atua como sensora e a segunda como proteína de resposta, atuando como ativadora transcricional. A ativação de NtrC ocorre por fosforilação, quando GlnB encontra-se uridililada ela deixa de interagir com NtrB e esta adota uma atividade quinase sobre NtrC. Quando está desuridililada, GlnB associa-se à NtrB, estimulando sua atividade fosfatase, e inativando NtrC, que é uma proteína ativadora transcricional do tipo σ -54 responsável

pela regulação de genes sensíveis a variações nos níveis de nitrogênio (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001).

No genoma de *H. seropedicae* foram encontrados dois genes que codificam para proteínas tipo PII (BENELLI et al., 1997). Os gene *glnB* que se localiza próximo ao gene *nadE1* (GENOPAR) e o gene *glnK* que é expresso a partir do operon *orf1glnKamtB* (NOINDORF, 2005). Assim como ocorre em Enterobactérias, as proteínas GlnB e GlnK de *H. seropedicae* são uridililadas pela enzima GlnD (BONATTO et al., 2007).

Além de ser modificada covalentemente por uridililação a atividade das proteínas PII também pode ser regulada pelos níveis de carbono e energia através da interação com os efetores alostéricos ATP, ADP e ao α -cetogluturato (NINFA, 2007).

Em 2007, Benelli et al. mostraram que o mutante *glnB⁻* de *H. seropedicae* não fixava nitrogênio. Este resultado, porém, não foi confirmado por Noindorf (2007), pois o mesmo mutante apresentou fenótipo Nif⁺. Por outro lado, a proteína GlnB mostrou-se importante na regulação da fixação de nitrogênio participando da ativação da transcrição dos genes da nitrogenase, por meio do controle da atividade de NifA (NOINDORF, 2007).

2.4. ENZIMAS NAD SINTETASES

O interesse pelas NAD sintetases nos últimos anos surgiu porque ela é uma enzima fundamental na síntese do cofator NAD. Por esta importância chave no metabolismo, o desenvolvimento de fármacos que tenham como alvo esta enzima em bactérias patogênicas pode ter importância médica (BELLINZONI, 2002).

Até agora são conhecidos 65 genes de NAD sintetases, distribuídos em 59 genomas. Os seguintes organismos apresentam duas cópias de *nadE*, com exceção de *Methanosarcina acetivorans*, que tem três *nadEs*: *Termotoga maritima*, *Clostridium acetobutylicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mezorhizobium loti* e *Methanosarcina acetivorans*. Ainda não se sabe qual a relevância funcional da presença de cópias adicionais de genes desta enzima.

As enzimas NAD sintetases de procariontes podem variar de acordo com a especificidade de substrato doador de grupos amino. Elas podem utilizar a amônia diretamente do meio, como ocorre em *Salmonella typhimurium* (HUGHES, 1988) e *E.*

coli (IMSANDE, 1961) ou a amônia proveniente da hidrólise do grupo amida da glutamina, o que exige uma região denominada amidohidrolase na proteína (PACE e BRENER, 2001). Os dois tipos de NAD sintetases apresentam um domínio comum, responsável pela amidação do ácido nicotínico adenina dinucleotídeo (NaAD). Durante esta reação uma molécula de ATP é hidrolisada a AMP e PPi, e um intermediário NaAD adenililado é formado, em seguida, ocorre a amidação, produzindo o NAD. Os primeiros estudos de NAD sintetases envolviam enzimas de levedura e de fígado e eritrócitos de mamíferos. Nestes organismos, a síntese de NAD ocorre utilizando como fonte do grupo amino da glutamina. Quando esta reação foi estudada em *E. coli* e outros procaríotos houve, no entanto, especificidade para NH_4^+ ao invés de glutamina (SPENCER e PREISS, 1966). Mas esta relação onde NAD sintetases de procaríotos seriam dependentes de NH_4^+ e de eucariotos de glutamina não se manteve de forma que se conhecem procaríotos capazes de utilizar glutamina, como *Mycobacterium tuberculosis* (BELLINZONE et al., 2005).

O domínio responsável pela hidrólise da amida da glutamina foi caracterizado por Pace e Brener (2001). NAD sintetases dependentes de glutamina fazem parte da super-família Nitrilase, que apresenta como motivos funcionais os aminoácidos cisteína, lisina e glutamato capazes de catalisar a hidrólise de ligações C-N. Esta super-família é composta por treze famílias, sendo nove com especificidade de substrato reconhecidas. Apesar do nome, apenas um dos ramos da super-família tem atividade de nitrilase, enquanto os outros oito ou apresentam atividade amidase – do qual faz parte o grupo das NAD sintetases dependentes de glutamina. Estes autores também estabeleceram seqüências de consenso flanqueando os aminoácidos com atividade catalítica do sítio ativo (Figura 1) (PACE e BRENER, 2001).



Figura 1 - Regiões de consenso do sítio ativo da região amidohidrolase das NAD sintetases dependentes de glutamina em procaríotos. Em vermelho, com o fundo amarelo, estão os aminoácidos da tríade catalítica, glutamato (E), lisina (K) e cisteína (C). Os outros aminoácidos em letras maiúsculas são conservados em 90% das enzimas da família e os demais, em letras minúsculas, estão os aminoácidos presentes apenas nas NAD sintetases dependentes de glutamina de procaríotos (modificado de PACE e BRENER (2001)).

Os genes *nadE1* e *nadE2* de *H. seropedicae* são homólogos a genes de NAD sintetases dependentes de glutamina. Além disso, a seqüência de aminoácidos predita

para as proteínas codificadas por estes genes apresentam o domínio funcional envolvido na hidrólise de glutamina (LASKOSKI, 2007).

Recentemente, foi revelada a primeira estrutura de uma NAD sintetase dependente de glutamina (Figura 2). A enzima homo-octamérica é formada por dois tetrâmeros dispostos paralelamente onde os domínios glutaminase ficam voltados para o lado interno da estrutura e os sintetase, para a borda externa; ela ainda é caracterizada por uma série de contatos formando túneis por onde a glutamina e a amônia têm acesso aos seus sítios ativos (aminoácidos destacados na figura 3). Estes túneis têm forma de U com extensão total de 73 Å. No ponto de inflexão está uma região chamada de alça YRE, que é próxima ao domínio glutaminase. Assim, a glutamina percorre parte do túnel em direção ao domínio glutaminase, no interior da estrutura, e a amônia produzida segue até a outra extremidade do túnel, no domínio sintetase (LARONDE-LEBLANC, RESTO e GERRATANA, 2009).

A região do túnel que dá acesso ao domínio glutaminase é composta por duas subunidades diferentes; para chegar ao domínio glutaminase da subunidade 5, por exemplo, a glutamina passa por uma região formada por contatos entre aminoácidos da subunidade 1 (primeiros dois terços, com resíduos pouco conservados pertencentes aos domínios sintetase e glutaminase desta subunidade) e a região glutaminase da subunidade 5 (outro terço, com aminoácidos conservados) (LARONDE-LEBLANC, RESTO e GERRATANA, 2009).

Enquanto os domínios glutaminase e sintetase em um mesmo monômero estão separados por aproximadamente 55 Å, estes mesmos domínios entre subunidades diferentes (1 e 5, por exemplo) estão separados por aproximadamente 35 Å. Então, apesar de cada subunidade apresentar um domínio glutaminase e um sintetase, a amônia liberada pelo sítio glutaminase é utilizada pelo domínio sintetase de outra subunidade em função da maior proximidade entre eles. O caminho que leva a amônia do sítio glutaminase para o sítio sintetase mede 40 Å, sendo que um terço desta parte do túnel é composto por resíduos pertencentes ao domínio glutaminase de uma subunidade e os outros dois terços são formados por resíduos do domínio sintetase de outra subunidade (no caso do túnel entre a glutaminase 5 e sintetase 1, por exemplo). Os resíduos que fazem estes contatos entre as subunidades e que são conservados em procariotos estão indicados na figura 3. Esse mecanismo de transporte da amônia inter-subunidades diferencia a NadE de *M. tuberculosis* de outras proteínas multiméricas com domínios glutaminase e sintetase na mesma subunidade e que

contém túneis para o transporte da amônia, pois, normalmente, estas vias são formadas por contatos entre aminoácidos de uma mesma subunidade (LARONDE-LEBLANC, RESTO e GERRATANA,2009).

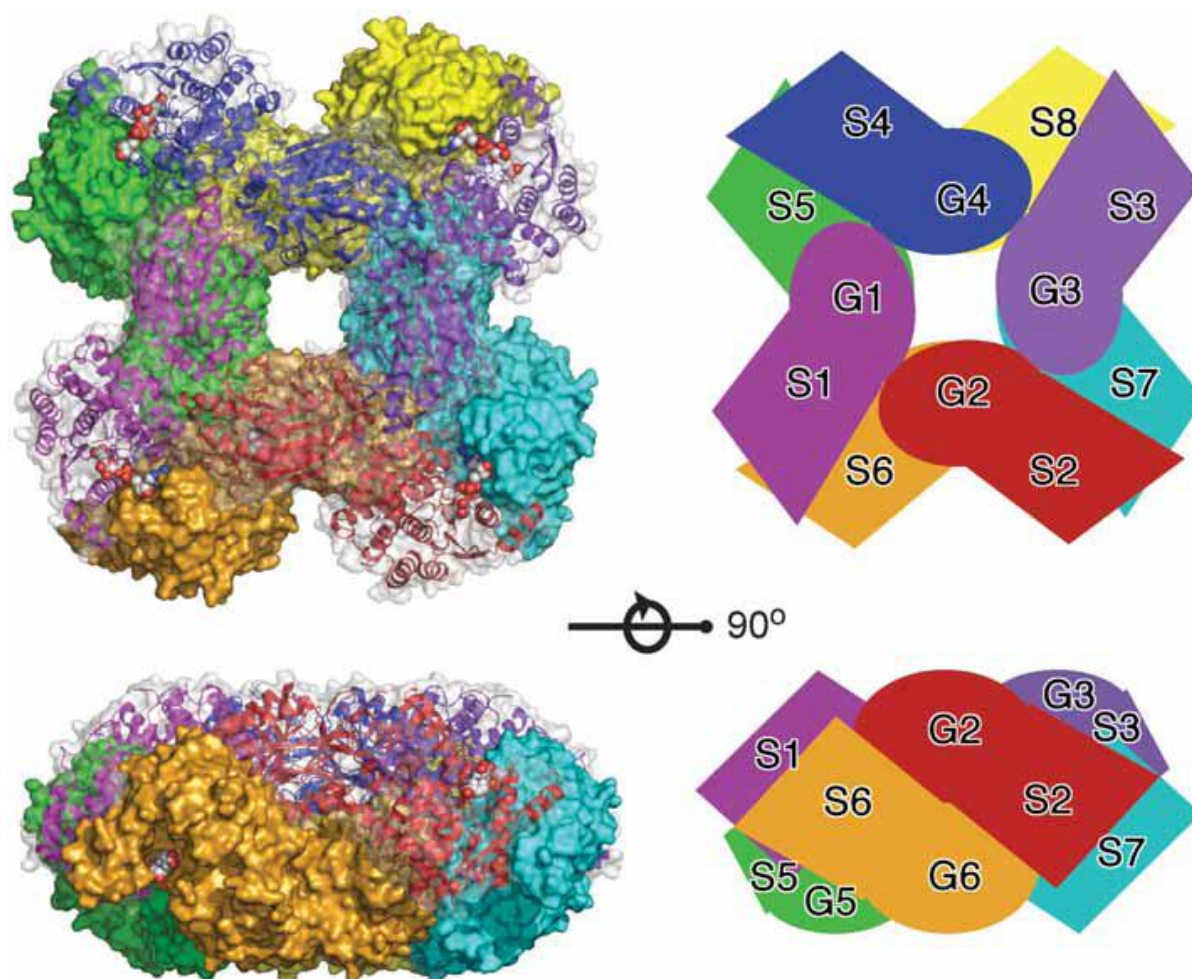


Figura 2 – Estrutura da NAD sintetase dependente de glutamina de *Mycobacterium tuberculosis*. Os domínios glutaminase, no centro, estão identificados pela letra G e os domínios sintetase, nas bordas, estão identificados pela letra S; ambos estão acompanhados pelos número que indicam suas respectivas subunidades.

Baseando-se na estrutura, na conservação de aminoácidos e em experimentos de atividade da NAD sintetase de *M. tuberculosis* LaRonde-LeBlanc et al. (2009) definiram uma série de resíduos importantes na organização dos túneis e na ativação do domínio sintetase em resposta a atividade glutaminase. A estrutura cristalográfica de *M. tuberculosis* mostra que os resíduos que fazem contato inter-subunidades no túnel de amônia são glutamato 129 (S₅), lisina 644 (S₁) e aspartato 656 (S₁). Esses

resíduos são conservados em procariotos e indicados na figura 3. Experimentos de atividade na NAD sintetase de no mutante aspartato 656 por alanina mostraram que o domínio glutaminase, diferentemente da estirpe selvagem, deixou de ser ativado em resposta aos substratos da reação catalizada pelo domínio sintetase. Este mutante, no entanto, permaneceu com a mesma atividade glutaminase basal que a estirpe selvagem. Além disso, este mesmo mutante deixou de transportar eficientemente a amônia produzida pelo domínio glutaminase para o domínio sintetase. Estes resultados mostram a importância deste resíduo no sincronismo entre as duas atividades e também no transporte da amônia inter-domínios (LARONDE-LEBLANC, RESTO e GERRATANA, 2009).

A região do túnel por onde passa a amônia apresenta aproximadamente 2 Å de diâmetro; o que é suficiente para a passagem da amônia. Diferentemente das NAD sintetases já caracterizadas, ela apresenta duas constrições, uma de 0,8 e outra de 1 Å, compostas por aminoácidos hidrofóbicos, o que também não havia sido descrito em outras NAD sintetases. Estas constrições provavelmente têm como função impedir o transporte de amônia para o sítio sintetase enquanto ele está ocupado, permitindo apenas quando ocorre a formação do intermediário NaAD adenililado. No final do túnel encontra-se outro aminoácido importante funcionalmente: o aspartato 497, que atua proximamente ao NaAD atuando como base para transformar o íon amônio transportado em amônia, se ele for transportado como tal, ou então, como última interação de hidrogênio se a amônia for transportada (LARONDE-LEBLANC, RESTO e GERRATANA, 2009).

O trabalho de LaRonde-LeBlanc et al. mostra outras características estruturais importantes no funcionamento da enzima. No domínio sintetase é observada alta semelhança estrutural entre as NAD sintetases dependentes de amônia e a NadE de *M. tuberculosis*. Ambas consistem de dímeros de domínios sintetase. A diferença é que a NadE de *M. tuberculosis* apresenta duas α -hélices adicionais, que são necessárias para a junção do oligômero. Além disso, muitas das hélices que são conservadas tanto nas NAD sintetases dependentes de amônia, quanto nas dependentes de glutamina são estendidas apenas na enzima de *M. tuberculosis*. Uma delas é α -hélice 9, que tem o segmento N-terminal estendido contatando o domínio glutaminase. O segmento C-terminal, por sua vez, contata a região de ligação do NaAD, no domínio sintetase S_6 através dos resíduos de arginina 354 e glicina 350 do túnel de amônia da subunidade S_1 , que são conservados nas NAD sintetases dependentes de glutamina (exemplo para

para a Glutamina, o grupo C não apresentou maior especificidade de um substrato com relação ao outro. Um motivo para que o grupo A apresente a maior eficiência de sincronismo é o mecanismo de ativação do domínio glutaminase. Diferentemente dos grupos B e C, nos quais a atividade glutaminase é estimulada apenas pela presença de um dos substratos do domínio sintetase, o NaAD ou o ATP juntamente com o NaAD, as NAD sintetases do grupo A só tem seus domínios glutaminase estimulados pela presença do intermediário AMP adenililado. Além disso, também foram encontradas eficiências diferentes na canalização da amônia produzida no domínio glutaminase para o domínio sintetase medidas pela estequiometria de síntese de NAD e hidrólise de glutamina. Na NAD sintetase de *M. tuberculosis* entre 73 e 95% da amônia produzida é utilizada para a síntese do NAD. Já em *S. cerevisiae* e *T. maritima* estes resultados ficaram entre 51 a 55 % e 19 a 36 %, respectivamente, dependendo das concentrações de glutamina (GERRATANA, YAFFE e RESTO, 2009).

Dois resíduos na alça YRE: a glutamina 129 e a fenilalanina 130 são conservados no grupo com maior eficiência catalítica. No grupo de eficiência intermediária apenas o resíduo de glutamina 129 é conservado, enquanto a fenilalanina 130 está conservada apenas no grupo C. Além disso, nenhum dos três resíduos que formam a segunda constrição hidrofóbica (leucina 486, leucina 639 e prolina 640) estão conservados nos grupos B e C (GERRATANA, YAFFE e RESTO, 2009).

2.5. AS VIAS BIOSSÍNTÉTICAS DO NAD

O NAD pode ser produzido através de vias de reciclagem, a partir de anéis de pirimidina como o ácido nicotínico e a nicotinamida, ou por uma via *de novo*, com três passos (Figura 4). Estas vias podem convergir para um ramo único, composto por dois passos, dentre os quais, NadE catalisa o último, ou então, para uma via alternativa de reciclagem, catalisada pela nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase (STANCEK et al., 2005; HUGHES, 1988; IMSANDE, 1961).

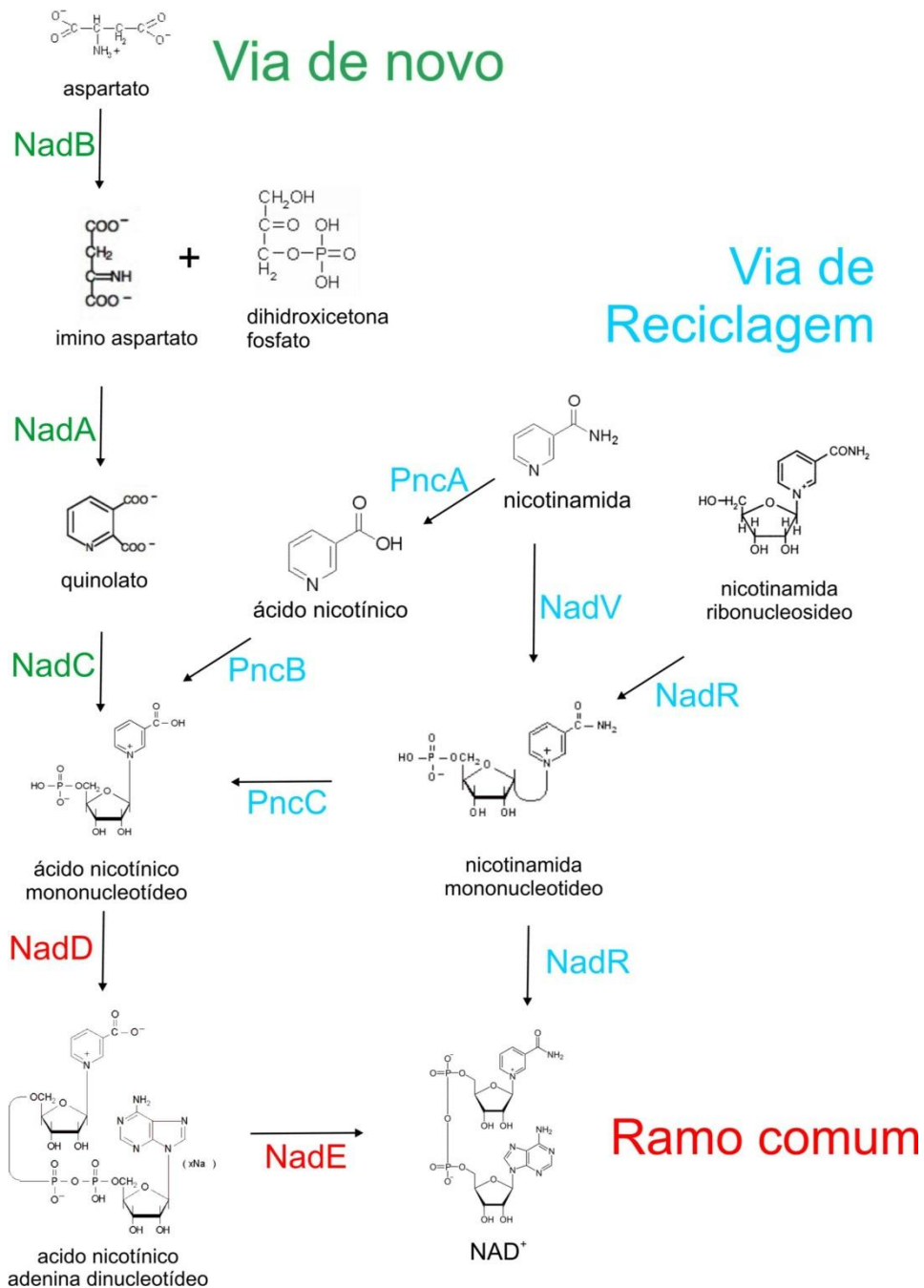


Figura 4 - Vias biossintéticas do NAD. Esquema mostrando as vias de síntese de NAD encontradas nos procaríotos. *Via de novo*: L-aspartato oxidase (NadB), quinolato sintase (NadA), ácido quinólico fosforribosiltransferase (NadC). *Via comum*: ácido nicotínico mononucleotídeo adenililtransferase (NadD) e NAD sintetase (NadE). *Vias de reciclagem*: nicotinamida deamidase (PncA), ácido nicotínico fosforribosiltransferase (PncB), nicotinamida fosforribosiltransferase (NadV) e a proteína multifuncional NadR, que tem atividade nicotinamida ribonucleosídeo quinase e nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase (modificado de STANCEK et al. (2005)).

2.5.1. Via de novo

O composto chave para a síntese de NAD pela via *de novo* é o quinolato. Para ser transformado em NAD, este composto precisa ser fosforribosilado, depois adenililado e, em seguida, amidado (BEGLEY et al, 2003).

O quinolato pode ser produzido em procariotos a partir do aspartato e, em alguns procariotos, e em eucariotos a partir do triptofano. A via que parte do triptofano é composta por cinco passos enzimáticos (BEGLEY, 2003). A síntese de quinolato a partir do aspartato ocorre após a oxidação deste à imino-aspartato, pela L-aspartato oxidase, numa reação dependente de O₂ ou de fumarato, seguida pela sua condensação com a dihidroxiacetona fosfato. O quinolato resultante é então fosforribosilado, pela quinolato fosforribosiltransferase, produzindo o ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN), que segue por um ramo que é comum às vias *de novo* e de reciclagem (FOSTER e MOAT, 1980).

2.5.2. Ramo comum

O ramo comum da via tem como composto inicial o ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN), que é adenililado pela enzima ácido nicotínico mononucleotídeo adenililtransferase (NadD) gerando o NaAD, que sofre, em seguida, uma reação de amidação, catalisada por NadE, produzindo o NAD (HUGHES, 1988; IMSANDE, 1961).

2.5.3. Vias de reciclagem

Nas vias de reciclagem podem ser utilizados como substratos a nicotinamida, o ácido nicotínico, ou a nicotinamida ribonucleosídeo (BEGLEY et al., 2003).

A nicotinamida e a nicotinamida ribonucleosídeo podem ser convertidos em NAD por um ramo comum às vias *de novo* e de reciclagem, passando pelo intermediário ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN), ou então por uma via alternativa passando pelo intermediário nicotinamida mononucleotídeo (NMN). Para passar pelo ramo comum o ácido nicotínico é fosforribosilado, sendo convertido em NaMN (KURNASOV et al., 2002).

A nicotinamida pode seguir esta mesma via, mas para isso ela é inicialmente deamidada pela nicotinamida deamidase. Já nas vias independentes do ramo comum, onde o NMN é o intermediário, a nicotinamida e a nicotinamida ribonucleosídeo podem ser precursores. Para tanto, a nicotinamida é adenililada pela nicotinamida fosforribosil adenililtransferase (NadV), enquanto a nicotinamida ribonucleosídeo deve ser fosforilada pela enzima multifuncional NadR (KURNASOV et al., 2002). O intermediário NMN é, então, convertido em NAD por adenililação pela NadR (BEGLEY et al., 2003) – esta proteína ainda pode ser reguladora transcricional, função descrita adiante no tópico sobre a regulação transcricional. Alternativamente, o NMN pode ser ainda deamidado, transformado-se em NaMN, e partir para o ramo comum (BEGLEY et al., 2003).

2.5.4. Regulação transcricional da via de novo e de reciclagem

Em 1988 foi identificado o gene *nadI*, que corresponde ao gene da proteína multifuncional *nadR*. Este gene codifica um inibidor transcricional de *NadA* e *NadB* em *Salmonella typhimurium*. Mutantes nulos neste gene passaram a expressar constitutivamente *nadA* e *nadB* independentemente de alterações fisiológicas que poderiam afetar a expressão destes genes (ROTH, 1988).

E. coli crescida em meio suplementado com ácido nicotínico, um precursor de uma via de reciclagem, apresentou síntese reprimida de quinolato. Além disso, a presença de NAD e NADH inibem a atividade da ácido quinólico sintetase (FOSTER e MOAT, 1980).

Em *Salmonella enterica* foram caracterizadas as atividades dos três domínios de *NadR*. Um domínio N-terminal foi capaz de reprimir a expressão dos genes *nadA*, *nadB* e *pncB* em resposta a baixos níveis de ATP e altos níveis de NAD. O C-terminal apresentou atividade nicotinamida ribonucleosídeo quinase, e o central mostrou fraca atividade nicotinamida adenililtransferase, relevante fisiologicamente apenas quando a via comum de síntese de NAD é bloqueada (ROTH, 2005).

Recentemente foi mostrado que em *Mycobacterium* a via de reciclagem é ativada em condições de hipóxia. Foi rastreada a incorporação de ¹⁴Nicotinamida e avaliada da expressão gênica por RT-PCR. Os genes da via de reciclagem foram fortemente induzidos em baixas concentrações de O₂, tal como observado em células isoladas de ratos cronicamente infectados (BARRY et al., 2008).

Em *Bradyrhizobium japonicum* associado às raízes de soja ocorre regulação da atividade das enzimas biossintéticas do NAD. Quando o microorganismo associa-se à planta ocorre uma queda na atividade destas enzimas (TEZUKA e MURAYAMA, 2002).

2.6. RE-SÍNTESE DE NAD E A INFLUÊNCIA DO OXIGÊNIO

O NAD é ressintetizado constantemente devido ao seu uso nos processos de sinalização celular (CHENG e ROTH, 1995). Essa ressíntese é aumentada consideravelmente dependendo dos níveis de oxigênio. Além disso, a concentração deste cofator ao longo do crescimento e dependendo das condições não se mantém constante (WIMPENNY e FIRTH, 1971).

Em condições de aerobiose as concentrações de NAD aumentam, e em anaerobiose diminuem. Estes resultados são mantidos em diferentes organismos. Os níveis de NADH, por outro lado, são mais constantes do que os níveis de NAD (WIMPENNY e FIRTH, 1971).

Em *Salmonella typhimurium* o ciclo do NAD é cinco vezes mais ativo sob condições aeróbicas do que em anaerobiose. Em altos níveis de O₂ o NAD é amplamente convertido em NMN por reações de sinalização e prontamente reciclado, por intermédio da nicotinamida mononucleotídeo deamidase, pois o aumento exagerado de NMN pode inibir enzimas que utilizam o NAD como substrato de sinalização (CHENG e ROTH, 1995).

2.7. O NAD COMO SINALIZADOR CELULAR

O NAD foi descoberto como co-fator em reações de óxido-redução na glicólise (revisado por BRENER et al., 2005). Desde então, foi demonstrada sua participação em diversas outras reações de óxido-redução com a inter-conversão entre NAD e NADH. Sendo que dentre as reações de oxido-redução conhecidas o NAD participa de 80% delas (FABER, 2004). Mais recentemente tem sido demonstrado o papel do NAD na sinalização celular em reações onde ocorre a sua “degradação”. Exemplos são a formação do ADP-ribosil cíclico, reações de ADP-ribosilação e a poli(ADP)ribosilação de biomoléculas (ZIEGLER et al., 2007).

No núcleo de células eucarióticas o NAD participa do silenciamento gênico, mediado pelas sirtuínas (SINCLAIR et al., 2003). No processo, as sirtuínas promovem a remoção de grupos acetil ligados a histonas liberando O-acetil-ADP-ribose (ZIEGLER et al., 2007). Ainda no núcleo, o NAD também é amplamente consumido em reações de poli ADP-ribosilação, pela poli (ADP-ribose) polimerase 1, que está envolvida no reparo de danos ao DNA de fita simples (ZIEGLER et al., 2006).

2.8. PREVISÃO DE INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA POR ANÁLISE GENÔMICA

Uma forma de prever relações entre proteínas é através da identificação de padrões de conservação de seus genes entre genomas distantes filogeneticamente. A disposição de genes em operons, a conservação da vizinhança em espécies filogeneticamente distantes, caracterizada pela proximidade de até 300 pares de base de distância entre os genes, além da fusão gênica (genes que se apresentam fusionados em alguns organismos e separados em outros organismos) são padrões que podem indicar relações funcionais entre proteínas (HUYNEN, 2000).

No genoma de *Mycoplasma genitalium* foram identificados 178 genes com vizinhança conservada em pelo menos três das espécies distantes filogeneticamente analisadas. Entre as proteínas codificadas por estes genes, pelo menos 63% interagem fisicamente, direta (30%) ou indiretamente (33%), na forma de complexos. Utilizando critério de seleção mais rigoroso, requerendo conservação da vizinhança em seis das espécies analisadas a porcentagem de proteínas que interagem fisicamente passou para 80% (HUYNEN et al., 2000).

No genoma de *H. seropedicae*, uma bactéria do filo proteobacteria, o gene que codifica a proteína GlnB encontra-se a 176 pares de base do gene que codifica a proteína NadE1 (GENOPAR). Em uma busca de conservação filogenética utilizando o programa STRING (<http://string.embl.de/>) e utilizando a β -proteobacteria *Azoarcus* como organismo modelo na busca, a relação NadE1/GlnB se mostrou conservada em 28 genomas, sendo sete espécies da divisão gama-proteobacteria, uma na delta-proteobacteria, uma Firmicutes e outra Chloroflexi. O escore desta análise foi de 0,79, considerada de alta confiança para a predição de interação funcional (Figura 5) (modificado Laskoski, 2007).

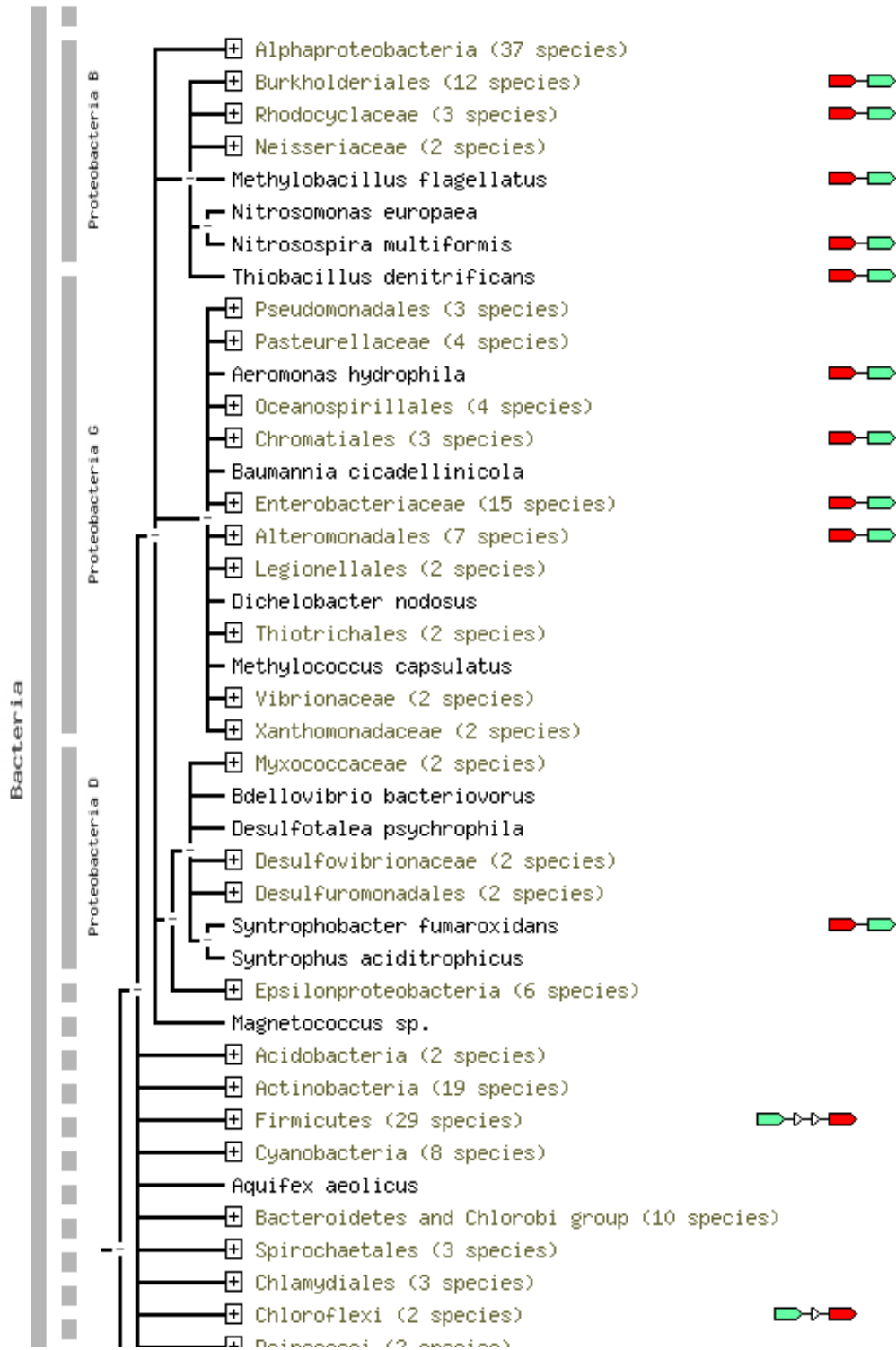


Figura 5 - Cladograma destacando alguns organismos com genes *nadE* próximos a genes *glnB*. As barras verdes representam *nadE*, as vermelhas *glnB* e as setas brancas indicam genes diferentes de *glnB* e *NadE*.

Realizando esta mesma busca utilizando a enzima NadE de *Rhodobacter* na busca, cuja NAD sintetase é dependente de NH_4 , como modelo o número de genomas onde os dois genes aparecem juntos passa para 52, mas o escore é de 0,56, pois neste organismo os dois genes não são encontrados próximos (HUYNEN et al., 2000).

1. JUSTIFICATIVA

Herbaspirillum seropedicae apresenta dois genes que codificam para NAD sintetases (*nadE1* e *nadE2*). O gene de *NadE1* já foi clonado e a proteína, purificada. Não se sabe, no entanto, se esta proteína foi purificada na forma ativa.

As NAD sintetases podem usar tanto glutamina, quanto a amônia como grupo doador de nitrogênio. Então, são necessários ensaios de atividade e análises cinéticas para a determinação da preferência por um destes substratos.

Não existem trabalhos mostrando uma relação funcional entre *NadE1* e *GlnB*. Na predição de interação utilizando o programa STRING foi obtida uma alta probabilidade de relação funcional (0,78) entre essas duas proteínas.

Dadas estas considerações, este trabalho pretende caracterizar enzimaticamente *NadE1* e *NadE2* e determinar uma possível relação entre *GlnB* e *NadE1*.

2. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho são a clonagem, expressão e purificação de *NadE2*, além da caracterização da atividade enzimática das enzimas *NadE1* e *NadE2*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Clonar o gene *nadE2*
- Expressar e purificar a proteína *NadE2*-his tag
- Purificar *NadE1*-his tag
- Determinar a atividade específica de *NadE1* e de *NadE2*
- Determinar os K_M aparentes para os substratos: ATP, NaAD, glutamina e amônia.
- Determinar a principal fonte doadora de grupamento amina para a síntese de NAD em *NadE1* e em *NadE2*: amônia ou glutamina

- Determinar o efeito de GlnB e de GlnB-U na atividade de NadE1
- Determinar a massa molecular da estrutura quaternária de NadE1 e de NadE2 por gel filtração

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizadas estão na Tabela 1.

TABELA 1 – ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Estirpes	Características	Referência ou fonte
<i>H. seropedicae</i>		
SMR1	estirpe selvagem, Sm ^R	Souza et. al., 2000
<i>Escherichia coli</i>		
DH10b	Nal ^r ; F'[proAB+ lacZΔM15]	SAMBROOK et al., 1989
BL21 (DE3)	pLysS. Expressa T7 RNA polimerase	Novagen
Plasmídeos	Características	Referência ou fonte
pETnadE1	pET28a contendo <i>nadE1</i> (2059 pb), clonado como um fragmento <i>NdeI/ BamHI</i> .	LASKOSKI, 2007
pET28a	KM ^R , vetor de expressão	Novagen
pETnadE2	pET28a contendo <i>nadE2</i> (1698 pb), clonado como um fragmento <i>NdeI/ BamHI</i> .	Este trabalho

5.2. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

H. seropedicae foi cultivado em meio sólido NFbHPN-malato (KLASSEN et al., 1997) em estufa (meios sólidos) ou sob agitação a 120 rpm (meio líquido), ambos a 30°C.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK, 1989) ou em meio SOB (SAMBROOK, 1989) sob agitação de 120 rpm, a 37°C ou em meio LA, a 37°C, suplementadas com os antibióticos adequados.

As composições dos meios de cultura utilizados estão na tabela 2, 3, 4 e 5.

TABELA 2 – MEIO NFB-MALATO:

(gramas/litro)

MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0.10 ⁻¹
NaCl	1,0.10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0.10 ⁻²
Ácido nitrilo-triacético	5,6.10 ⁻²
Fe-SO ₄ .7H ₂ O	2,0.10 ⁻²
Ácido málico	5,0
Biotina	1,0.10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,0.10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35.10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8.10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0.10 ⁻⁵
KH ₂ PO ₄	4,0
K ₂ HPO ₄	6,0

Para o meio NfbHPN-malato foram adicionadas no momento do uso soluções estéreis de NH₄Cl (20 mmol/L de concentração final) e a mistura de fosfatos. Para a obtenção do meio sólido foi adicionado ágar ao meio líquido na concentração de 15 g/L.

TABELA 4 – MEIO SOB

(gramas/litro)

Bacto triptona	20,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	0,5
Cloreto de potássio	0,186
Sulfato de magnésio	2,4

O pH foi ajustado para 7 com NaOH 2 mol/L.

O meio SOC foi obtido com a adição de glucose 20 mmol/L ao meio SOB.

TABELA 5 – MEIO LB:

	(gramas/litro)
Extrato de levedura	5
NaCl	10
Triptona	10

5.3. ANTIBIÓTICOS

Para seleção e manutenção dos plasmídeos foram utilizados os antibióticos mostrados na TABELA 6.

TABELA 6 -ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Concentração
Canamicina (Km)	100 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	80 µg/mL

As soluções foram preparadas em água destilada autoclavadas, esterilizadas por filtração e mantidas a 4°C.

5.4. MANIPULAÇÕES DE DNA

5.4.1 Amplificação através da reação em cadeia da enzima DNA polimerase

Os oligonucleotídeos iniciadores para *nadE2*: 5' - GGA TGC CAT ATG CTT CGC ATC GCC ATC G - 3' (com sítio de restrição para *NdeI*) e 5'- AAC AGG GAT CCA TGG CAA TCG GGT CC -3' (com sítio de restrição para *BamHI*) foram sintetizados baseando-se na seqüência obtida através de busca no banco de dados GENOPAR. O gene *nadE2* foi identificado com o auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os sítios de reconhecimento para as enzimas *NdeI* e *BamHI* foram introduzidos para posterior clonagem no vetor de expressão pET28a. Como molde para a reação foi utilizada uma cultura de *H. seropedicae* diluída em água

e fervida por 5 minutos. Para minimizar o risco de mutações a reação foi realizada utilizando a enzima Fidelity taq DNA polimerase, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

5.4.2 Eletroforese em gel de agarose

Este procedimento foi realizado como descrito por Sambrook et al. (1989). O gel de agarose foi preparado utilizando o tampão TAE (Tris acetato 40 mmol/L pH 8,0 e EDTA 1 mmol/L). Foi utilizada concentração de 1% de agarose. O DNA foi corado com brometo de etídeo e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um sistema de vídeo (UVP Bioimaging Systems).

5.4.3 Clivagem do DNA com enzimas de restrição

As endonucleases de restrição foram utilizadas nos processos de clonagem e para a confirmação de clones. As condições das reações seguiram as especificações fornecidas pelos fabricantes das enzimas (Invitrogen e Fermentas). O sistema de restrição foi composto por DNA plasmidial purificado, 2,5 U de enzima em tampão adequado. A reação ocorreu a 37° C pelo período necessário para que na análise de restrição, por eletroforese em gel de agarose, fosse verificada o(s) fragmento(s) esperado(s) para cada reação.

5.4.4 Reação de ligação

Em cada reação o vetor foi linearizado pela ação das enzimas de restrição adequadas. Paralelamente, o inserto produzido por PCR foi cortado com as mesmas enzimas. Em seguida, estas enzimas foram removidas utilizando o kit de purificação (Qiagen) e os fragmentos de interesse ligados a uma razão molar entre inserto e vetor de aproximadamente de 10:1, na concentração total de DNA de aproximadamente 10 ng/uL. Para a reação de ligação foram utilizados o DNA, um tampão de ligação (Invitrogen), água deionizada e a enzima T4 DNA ligase (1 U) em um volume de 10 microlitros. A DNA ligase foi adicionada após resfriamento do sistema, previamente

aquecido a 60° durante um minuto. A reação foi incubada por uma noite, a 16°C. O produto da reação foi utilizado para subsequente eletroporação.

5.4.5 Reação de seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas num sequenciador automático (Applied Biosystems, modelo 377) utilizando o sistema DYEnamic ET terminator (GeHealthcare). O sistema foi composto por 4 microlitros da solução DYEnamic ET terminator, 0,5 pmol de oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente um micrograma de DNA plasmidial purificado, num volume total de 10 microlitros. Os seguintes oligonucleotídeos iniciadores foram usados para sequenciar internamente *nadE1*: primer NadE1A (5'CTG AAG GTC GAT CAC CAG^{3'}), primer NadE1B (5'GTG CTG GTG AAC CTG TCG^{3'}), primer NadE1C (5'ACC TTC GGT CAG TCG GTG^{3'}), primer NadE1D (5'AAC ATC CTG GCC TAT ACC^{3'}), primer NadE1E (5'GAC CAC ATG TCG CAC TAC^{3'}) e os primers promotor e terminador do T7.

Os sistemas de reação foram preparados e distribuídos em tubos de plástico para PCR protegidos da luz e mantidos a 4°C até a reação. As reações consistiram na repetição de 30 ciclos consecutivos de 95 °C (30 segundos), 55°C (30 segundos) e 60°C (60 segundos).

As reações foram então precipitadas adicionando 90 microlitros de uma solução de isopropanol a 65% e centrifugando a 13000 rpm por 30 minutos em uma centrífuga de mesa. Ao precipitado foi adicionado etanol 70% e este foi novamente centrifugado por 30 minutos. O DNA precipitado foi seco em temperatura ambiente e, em seguida, dissolvido em 4 microlitros de tampão formamida, desnaturado (96°C por 2 minutos) e submetido à eletroforese no seqüenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

O gene *nadE2* clonado não foi sequenciado.

5.4.6 Preparo de células eletrocompetentes

Cinco mililitros de meio LB contendo antibióticos foram inoculados com *E. coli* e cultivados por 16 horas. Duzentos microlitros deste pré-inóculo foram utilizados para inocular 200 mililitros de meio LB, também com antibióticos. A cultura foi incubada sob agitação constante a 37° C até uma D.O.₆₀₀ aproximada de 0,7, quando foi transferida para um tubo de centrifuga estéril previamente resfriado e a partir deste momento ela foi mantida no gelo. A suspensão foi centrifugada a 2500 g a 4° C durante 5 minutos. O sedimento foi lavado com 40 mililitros de água estéril gelada, centrifugado e ressuspenso com 40 mililitros de glicerol 15% gelado e, após nova centrifugação, o glicerol foi removido por inversão e as células ressuspendidas na solução de glicerol restante no tubo. As células foram separadas em alíquotas de 100 microlitros e armazenadas a -70°C por até dois meses.

5.4.7 Transformação bacteriana por eletroporação

Um microlitro do produto de ligação ou 0,4 microlitros da solução do plasmídeo purificado foram utilizados para transformar 100 microlitros de células eletrocompetentes. A solução foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida a um campo elétrico para induzir a entrada do DNA na bactéria seguindo as instruções do fabricante (BIORAD). Em seguida, as células foram transferidas para 1 mililitro de meio SOC e mantidas para recuperação a 37°C por uma hora. A suspensão foi então plaqueada em meio LA, com antibiótico apropriado.

5.4.8 Purificação de DNA plasmidial

A purificação de DNA plasmidial foi realizada pelo método da lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Um mililitro de cultura cultivada durante 16 horas em meio LB, com antibiótico adequado, foi centrifugado a 13000 rpm por um minuto. As células sedimentadas foram ressuspendidas em 150 microlitros de GET (50 mmol/L de glicose, 25 mmol/L de Tris HCl pH 8,0 e 10 mmol/L de EDTA pH 8,0) e a lise efetuada com a

adição de 150 microlitros de uma solução de SDS 1% e NaOH 200 mmol/L. O DNA cromossomal foi precipitado com 150 microlitros de uma solução acetato de potássio 3 mol/L, pH 4,8. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 200 microlitros de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1. Esta solução foi então centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante transferido para um tubo contendo dois volumes de álcool 96% para precipitar o DNA plasmidial. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado e centrifugado como anteriormente com um 1 mililitro de álcool 70%. O precipitado foi então ressuspensionado em 50 microlitros de água deionizada autoclavada e incubada por 2 horas a 37°C com 1 microlitro de RNase (10mg/mL).

5.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

5.5.1 EXPRESSÃO E LISE PROTÉICA

Três colônias da estirpe BL21 contendo o plasmídeo pETNadE1 ou pETNadE2 foram inoculadas em cinco mililitros de meio LB com o antibiótico canamicina e incubados por uma noite a 37°C. Quatro mililitros deste pré-inóculo foram adicionados a 400 mililitros de meio LB, com o mesmo antibiótico, e incubados a 37°C até uma D.O.₆₀₀ aproximada de 0,5. Uma solução de IPTG foi adicionada ao inóculo equilibrado termicamente na temperatura de indução obtendo-se uma concentração final de 300 µmol/L. A indução da expressão foi realizada durante a noite, a 16°C, para reduzir as chances de formação de corpos de inclusão, e mantida sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por cinco minutos a 4°C e 5000 rpm. O sedimento celular foi ressuspensionado em 30 mililitros de uma solução composta por Tris HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 100 mmol/L e glicerol 10% (Tampão de sonicação). Em seguida, as células foram transferidas para um béquer e lisadas por sonicação, sendo mantidas em banho de gelo. A sonicação foi realizada em pulsos de 15 segundos com intervalos de 15 segundos até completar 2 minutos e 15 segundos. Após pausas maiores, com intervalos de um minuto o ciclo de lise descrito foi repetido duas vezes. As frações solúvel e insolúvel resultantes do lisado celular foram separadas por centrifugação a

30000 g, durante 30 minutos, a 4°C e analisadas por eletroforese SDS-PAGE, como descrito por Laemmli (1970).

5.5.2 Purificação de proteínas

As proteínas NadE1-his e NadE2-his foram purificadas com um gradiente crescente de imidazol em uma coluna HiTrap™ Chelating HP de 5 mililitros, carregada com Ni²⁺, previamente preparada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (GE-Healthcare). A coluna foi acoplada a um sistema de bomba peristáltica (GE-Healthcare). A cânula do sistema de bombeamento, sem a coluna, foi lavada com 10 mililitros de água. Em seguida, a coluna foi acoplada à cânula e percolada com 20 volumes de água deionizada autoclavada para lavagem da mesma. Um mililitro de NiCl₂ 100 mmol/L foi aplicado da coluna e esta foi percolada novamente com 20 volumes de água para retirada do Níquel não ligado. A coluna foi então equilibrada com cinco volumes do tampão de sonicação. A fração solúvel foi aplicada, as proteínas foram eluídas de acordo com a afinidade pelo níquel utilizando os seguintes tampões, na ordem e volumes indicados. Tampão de sonicação (10 volumes de coluna) e tampões 2, 3 e 4, que consistiram no tampão de sonicação acrescidos de 50, 100 e 300 mmol/L de imidazol (3 volumes de coluna, cada). Uma alíquota de 50 mililitros do primeiro tampão e três alíquotas de 5 mililitros para cada um dos demais tampões foram coletadas em tubos e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. As frações contendo a proteína de interesse em maior quantidade e pureza foram dialisadas durante 12 horas contra uma solução Tris HCl 50 mmol/L, NaCl 100 mmol/L e glicerol 50% a 4°C. As frações dialisadas foram separadas em alíquotas e armazenadas a -70°C.

5.5.3 Eletroforese 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 2 mmol/L e azul de bromofenol 0,02%) e desnaturadas a 90°C durante 3 minutos.

Alíquotas de 15 microlitros foram aplicadas em gel de poliacrilamida. Os géis de separação foram montados com 10% de poliacrilamida e os de empilhamento 4%, utilizando como suporte o sistema Höefer (GE Healthcare). A relação de acrilamida e bis-acrilamida nos dois géis foi de 29:1. As eletroforeses foram realizadas numa voltagem de 140 V durante o tempo necessário para o azul de bromofenol atingir a base do gel. O tampão de corrida foi composto por Tris 25 mmol/L pH 8,3, glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%. Os géis foram corados com Coomassie Blue.

5.5.4 Dosagem de proteínas

A concentração protéica total em extratos celulares foi determinada pelo método de Bradford (1976). Como padrão no método de Bradford foi utilizado o BSA (albumina de soro bovino). Alíquotas das soluções com concentração protéica desconhecida foram diluídas de forma a obter soluções de concentração dentro do intervalo da curva padrão. O sistema foi composto pela mistura de 100 microlitros de solução de proteína e 1 mililitro de solução corante (Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L, etanol 95% e ácido fosfórico 85%), previamente filtrada e homogeneizada. Duzentos microlitros deste sistema foram transferidos para placas de 96 poços e a absorbância em 595 nm foi determinada com um leitor de placas. A concentração protéica foi determinada interpolando as absorbâncias das soluções de concentração desconhecidas na curva padrão de BSA.

5.6 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR MALDI-TOF/MS

Fragmentos de gel SDS-PAGE foram extraídos e descorados em tubos de plástico por lavagens sucessivas com uma solução de bicarbonato de amônio a 25 mmol/L e 50% de acetonitrila. Os fragmentos foram então desidratados com acetonitrila 100%. A digestão com tripsina foi realizada reidratando o gel com uma solução contendo tripsina 10 ug/mL em tampão bicarbonato de amônio 25 mmol/L pH 8 e acetonitrila 10% durante 30 minutos a 4°C e, em seguida, incubando este sistema, durante 16 horas a 37 °C. Um microlitro do sistema de digestão foi misturado com 1 microlitro de uma solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 0,1% saturada com a matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamico). As amostras foram aplicadas em

uma placa de MALDI até cristalizarem. Os espectros foram adquiridos usando um espectrômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A aquisição das massas foi realizada no modo positivo utilizando 20 kV. A lista de picos foi criada usando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

5.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.7.1 Determinação da atividade enzimática

A formação de NAD pela enzima NAD sintetase (NadE1 ou NadE2) foi determinada através do acoplamento com a reação catalisada pela álcool desidrogenase (ADH), que reduz o NAD a NADH. Este último pode ser quantificado pela absorvância em 340 nm (modificado YU e DIETRICH, 1972).

Os ensaios de atividade foram realizados considerando a região da curva de reação por tempo onde a velocidade de formação do produto foi linear em relação ao tempo de incubação. O sistema de reação teve a seguinte composição: NadE1 ou NadE2 entre 20 e 160 nmol/L (monômero), ADH entre 0 e 6 U, MgCl₂ 20 mmol/L, KCl 20 mmol/L, Tris HCl 62 mmol/L pH 8,5, etanol 1,6%, Ditioneitol (DTT) 10 mmol/L, ATP 10 mmol/L, NaAD 1 mmol/L e glutamina ou NH₄Cl, ambos a 10 mmol/L, totalizando 100 microlitros.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços a 30°C em leitor de placas Tecan Infinity® 200. As reações foram disparadas com um dos substratos de NadE através de um dispensador automático e a leitura da absorvância foi medida continuamente em 340 nm com intervalos de 20 segundos. Os resultados em absorvância foram gerados em planilhas do Excel. Os resultados em absorvância foram convertidos em dados de concentração de acordo com uma curva padrão com concentrações conhecidas de NADH. Uma unidade foi definida como a quantidade de proteína capaz de produzir um micromol de produto durante um minuto (modificado YU e DIETRICH, 1972).

5.7.2 Estudos de cinética enzimática

A composição do sistema de reação diferiu da utilizada para a determinação da atividade enzimática quanto a concentração dos substratos de NadE1. Para a

determinação do K_M as concentrações de substrato foram variadas da seguinte forma: glutamina entre 0 e 10 mmol/L, NH_4^+ entre 0 e 100 mmol/L, ATP entre 0 e 20 mmol/L, e NaAD entre 0 e 2 mmol/L. Enquanto a concentração de cada um dos substratos variou dentro da faixa descrita acima as concentrações dos outros foram mantidas constantes e saturantes. Para cada condição foi tomada a medida da velocidade inicial.

5.7.3 Determinação da velocidade inicial

A velocidade inicial (V_o) foi determinada plotando o aumento da concentração de NADH contra o tempo. Para determinar a constante de Michaelis-Menten (K_M), foram obtidos valores de V_o variando-se a concentração de um dos substratos e mantendo os demais substratos em concentrações saturantes. O K_M aparente e a velocidade máxima foram determinados através da linearização de Hanes-Woolf e cuja equação é a seguinte: $\frac{S_o}{V_o} = \frac{K_M}{V_{\max}} + \frac{S_o}{V_{\max}}$. Para determinação dos parâmetros cinéticos de cada um dos substratos foram considerados dados de no mínimo dois experimentos independentes. A linearização de Eadie Hofstee foi utilizada para analisar a faixa de concentração de substratos utilizada; a equação é a seguinte: $V_o = -K_M \frac{V_o}{[S]} + V_{\max}$.

5.8 CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO

A cromatografia de gel permeação foi utilizada para determinação da massa molecular de proteínas. A coluna Superose-6 foi acoplada ao sistema AKTA e a análise foi realizada seguindo o protocolo do fabricante (GE-Healthcare). A coluna foi lavada com água deionizada autoclavada e, em seguida, equilibrada com tampão A (Tris HCl 50 mmol/L pH 8,5, NaCl 100mmol/L, Glicerol 10%).

Uma curva de calibração foi montada utilizando como padrões a albumina (66 kDa), a álcool desidrogenase (150 kDa), o citocromo C e a β -amilase (200 kDa). O blue dextran (2000 kDa) foi usado para determinar o volume morto. O logaritmo da massa de cada proteína foi plotado contra o coeficiente de partição de cada proteína, definido como o K_{av} , que é dado pela razão entre o volume de eluição da proteína menos o

volume morto e o volume da coluna menos o volume morto. A massa desconhecida foi determinada interpolando o K_{av} da mesma na equação de reta obtida a partir da curva padrão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. PURIFICAÇÃO DE NadE1

O gene *nadE1* foi expresso e NadE1 purificada da mesma forma descrita em Laskoski (2007). A proteína foi purificada com rendimento de 5 mg de proteína por litro de cultura. O perfil de eluição de NadE1 está indicado na figura 6. Foi notada uma redução no nível de expressão em culturas de bactérias recém transformadas, comparando-se com bactérias transformadas e armazenadas em glicerol. Por este motivo em toda purificação de NadE1 foram feitas transformações recentes da estirpe de expressão BL21.

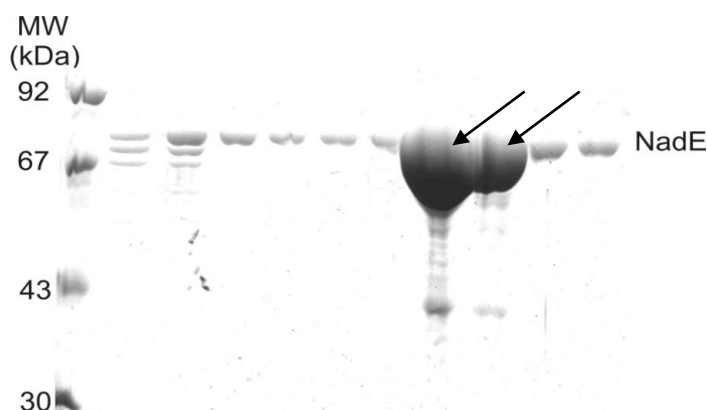


Figura 6 – Perfil eletroforético de uma purificação de NadE1 em SDS-PAGE 10%, corado com Comassie blue R-250. Na linha identificada como MW está o marcador de massa molecular, dado em kDa. Nas bandas identificadas como NadE estão as frações onde NadE1 foi eluída. Onde há indicações por setas houve o pico de eluição, em 300 mM de imidazol.

6.2. CLONAGEM DE *nadE2*

O gene *nadE2* foi amplificado por PCR usando um par de oligonucleotídeos iniciadores flanqueando o gene *nadE2* de *Herbaspirillum seropedicae* e como molde o DNA genômico do mesmo organismo.

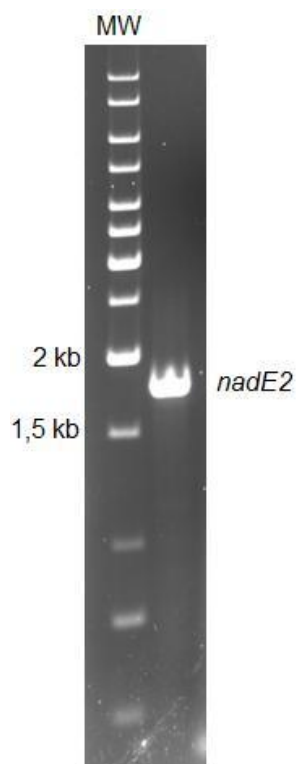


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, contendo o produto de amplificação do gene *nadE2* de *H. seropedicae*. MW indica o marcador de massa molecular, ao lado das bandas do marcador estão as indicações de suas respectivas massas, 1,5 e 2 kb. A altura da banda identificada como *nadE2*, entre os marcadores de massa de 1,5 e 2 kb, corresponde aquela esperada para sua massa (1698 pb).

O fragmento de DNA contendo os 1698 pares de base esperados (Figura 7) produzido pela reação de PCR foi clonado no vetor pET28a, gerando o plasmídeo pETNADE2 (Figura 8).

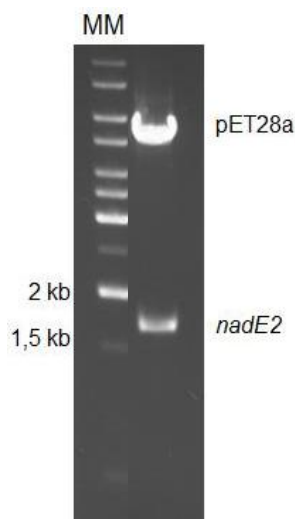


Figura 8—Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etideo, contendo os fragmentos de restrição de pETNADE2 digerido com as enzimas NdeI e BamHI. MM indica a linha contendo o marcador de peso molecular; em destaque as massas do marcador identificadas como 2 kb e 1,5 kb. Como pET28a está identificada a banda contendo o fragmento de restrição com tamanho esperado para o vetor; o fragmento identificado como *nadE2* corresponde a aquele com tamanho esperado para o gene (1698 pb).

6.3. PURIFICAÇÃO DE NadE2

O plasmídeo pETNADE2 foi introduzido por eletroporação na estirpe de *E. coli* BL21 (DE3). Após a indução da expressão usando IPTG His-NadE2 foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma resina Hi-trap chelating carregada com níquel; NadE2 foi eluída em 150 mM de Imidazol (Figura 9). As frações consideradas mais puras foram agrupadas após da diálise. O rendimento padrão da purificação foi de aproximadamente 30 mg de proteína por litro de cultura as frações mais concentradas chegaram até 14 ug de proteína por microlitro.

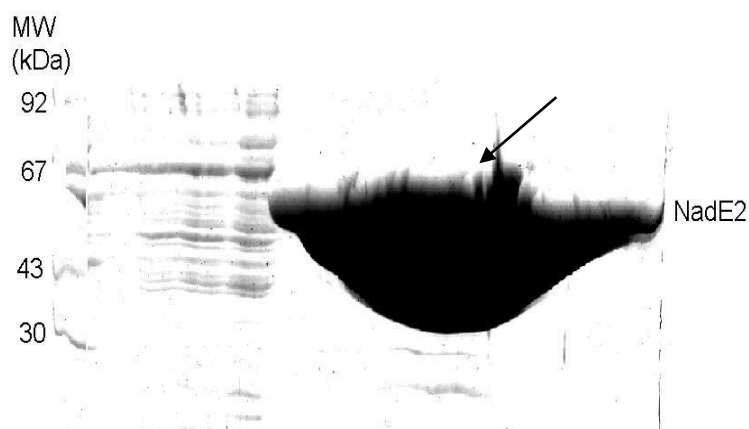


Figura 9 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% da eluição de NadE2. Os marcadores de massa molecular estão indicados como MW em kDa. Foram aplicados 10 μ L do eluato por poço. As bandas sobrepostas na região indicada pela seta mostra as frações onde ocorreu o pico de eluição de NadE2, em 150 mM de imidazol.

As identidades das proteínas NadE1 e NadE2 foram confirmadas através de espectrometria de massas MALDI-TOF. A identidade da proteína NadE1 havia sido previamente confirmada por LASKOSKI, 2007. A análise por espectrometria da proteína NadE2 revelou que nove picos gerados pela digestão com tripsina (Figura 10), detectados espectrometricamente coincidiram com peptídeos teóricos do banco de dados de *H.seropedicae* a cobertura da proteína foi de 17% confirmando que a proteína purificada é NadE2.

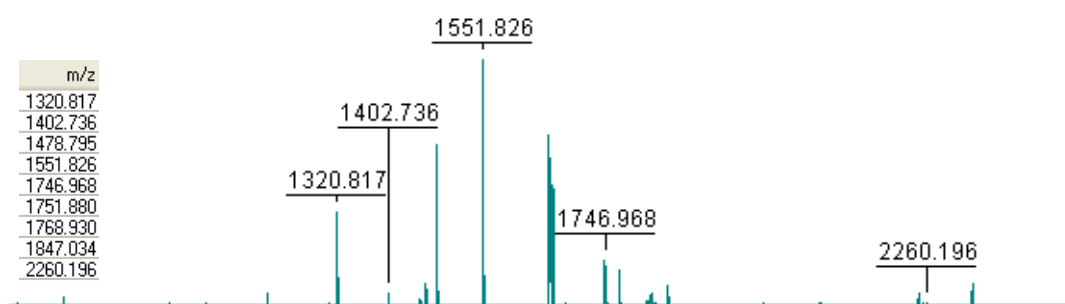


Figura 10 - Espectro de NadE2 tripsinizada obtido por MALDI-TOF ao lado das listas de picos monoisotópicos gerados pelo programa flexAnalysis. A lista dos peptídeos contém as relações massa carga dos picos detectados e que são compatíveis com peptídeos da digestão *in silico* da proteína.

O gene de *nadE1* foi completamente seqüenciado; não foram encontradas mutações que resultaram em troca de aminoácido. Os primers para o sequenciamento interno de *nadE2* foram sintetizados, mas o gene clonado não foi sequenciado.

6.4. GEL FILTRAÇÃO

Diferentemente das NAD sintetases dependentes de amônia, que são homodiméricas, as NAD sintetases dependentes de glutamina cujas estruturas quaternárias foram determinadas apresentam estrutura homo-octamérica (LARONDE-LEBLANC, RESTO e GERRATANA, 2009)

Para estimar o número de subunidades que compõe a estrutura de NadE1 e NadE2 foram realizados ensaios de Gel Permeação. O volume de eluição destas proteínas foi utilizado para determinar, por interpolação na equação da curva padrão obtida, a massa molecular de NadE1 e NadE2 (Figura 11).

A proteína NadE2 foi eluída em 15,3 mililitros (Figura 12), que corresponde a uma massa de 84 kDa, próximo ao esperado para a estrutura monomérica (64 kDa). Este resultado pode explicar em parte a falta de atividade observada *in vitro*. É possível que a enzima tenha sido purificada desnaturada e, enzimaticamente inativa. Uma série de fatores podem contribuir para isso, como o sistema de expressão heterólogo, que não reproduz fielmente as condições nas quais a proteína é normalmente expressa; o mesmo pode-se dizer dos tampões utilizados durante a purificação e a presença da cauda de histidinas, que também pode interferir no enovelamento protéico e resultar na perda de atividade. Além disso, apesar de o gene ter sido amplificado com uma enzima com atividade revisora, ele não foi posteriormente sequenciado para confirmar que não houve mutação durante a clonagem. Não se pode descartar também que NadE2 tenha adquirido uma nova função e, portanto, uma estrutura quaternária distinta das NAD sintetases, já que o organismo dispõe de uma enzima com função de NAD sintetase ativa, a NadE1.

A eluição de NadE1 foi precedida por um pico correspondente ao volume morto (Figura 13). Logo a seguir, foi detectado um pequeno pico, como um ombro antes do pico de eluição de NadE1. Estes picos que precederam NadE1 ocorreram devido a agregados protéicos com massas superiores à massa esperada para NadE1. Esses agregados podem ser formados por aglomerados de monômeros desnaturados de NadE1 que podem interagir através de regiões hidrofóbicas formando agregados com massas superiores aquelas esperadas. O pico de eluição ocorreu no volume de 12,6 mL, que corresponde a uma massa de 548 kDa, equivalente a soma de sete subunidades.

Apesar desta faixa de massa estar dentro da faixa de separação da coluna utilizada (Superose 6), todos os padrões utilizados para obtenção da curva de calibração são de massa inferior a 200 kDa. A ausência de padrões de massa molecular adequados pode ter influenciado na precisão da determinação da massa de NadE1. Apesar de o resultado sugerir um heptâmero, acredita-se que NadE1 apresenta estrutura quaternária octamérica, como as demais NAD sintetases dependentes de glutamina já caracterizadas.

Esta diferença observada entre as massas moleculares de NadE1 e NadE2 pode explicar os padrões obtidos nas eluições destas proteínas na purificação por cromatografia de afinidade, pois a estrutura quaternária pode modificar a forma como as proteínas interagem com a resina durante a purificação.

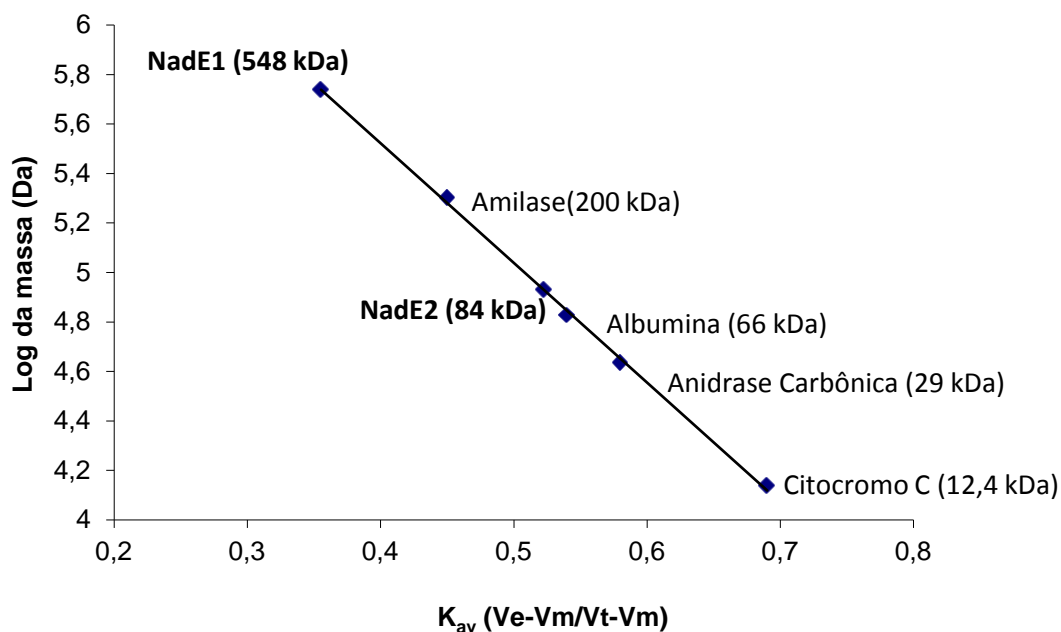


Figura 11 – Gel filtração de NadE1 e de NadE2 em Superose 6 em sistema AKTA-FPLC. O perfil de eluição de NadE1 e de NadE2 foi analisado com base na curva padrão obtida a partir dos padrões de massa: Amilase (200 kDa), Albumina (66 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa) e Citocromo C (12,4 kDa).

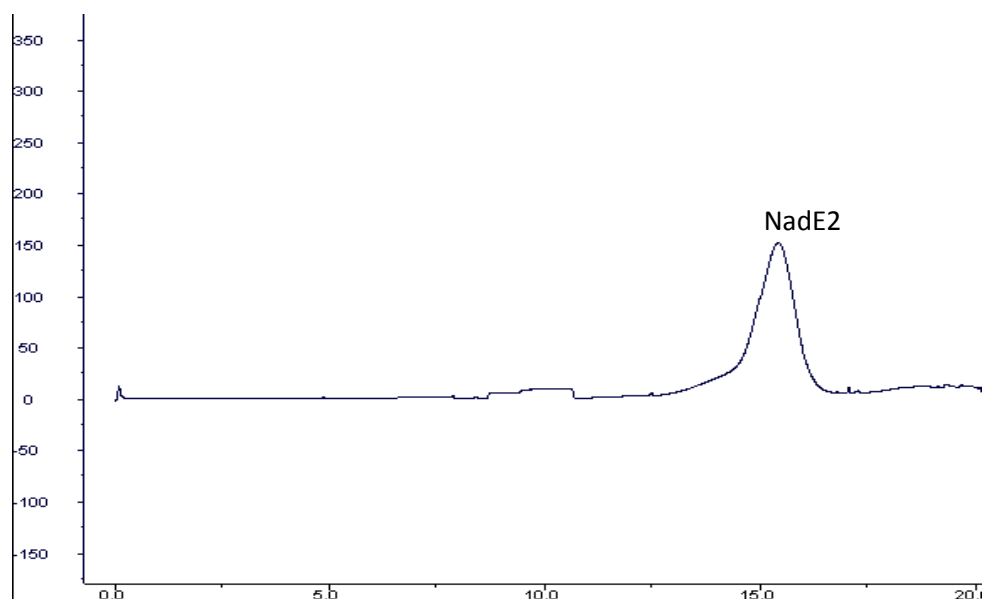


Figura 12 – Perfil de eluição de NadE2 em purificação de Gel Permeação realizada em sistema AKTA-FPLC. O pico de eluição de NadE2 ocorreu em 15,3 mL, que corresponde a massa de 84 kDa. O eixo das ordenadas mostra a intensidade de absorbância, lida em 280 nm, o eixo das abcissas mostra o volume de eluição.

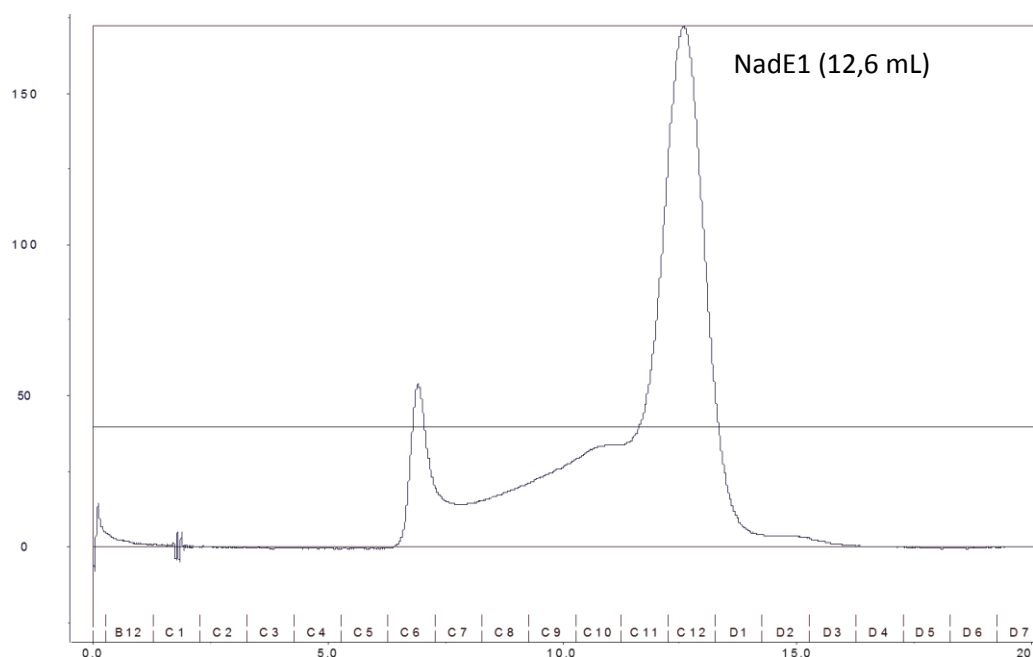


Figura 13 – Perfil de eluição de NadE1 em Gel Permeação realizada em sistema AKTA-FPLC. O eixo das ordenadas mostra a intensidade de absorbância, lida em 280 nanômetros, o eixo das abcissas mostra o volume de eluição e a identificação das frações coletadas, identificadas pelos números acompanhados de letras. O pico de eluição de NadE1 ocorreu em 12,6 mililitros, que corresponde a massa de 548 kDa.

6.5. ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os experimentos enzimáticos foram realizados utilizando ensaio acoplado contínuo. Este ensaio tradicionalmente se aplica quando o produto de uma reação não pode ser medido diretamente de forma fácil; ou então, quando o produto tem efeito inibitório sobre a atividade enzimática suficientemente grande para prejudicar sua medida (CORNISH-BOWDEN, 1995).

A enzima auxiliar utiliza um dos produtos da primeira enzima como substrato, convertendo-o em um segundo produto, que pode ser medido mais facilmente. O uso de ensaios acoplados têm certas restrições. A segunda enzima precisa ser rápida o suficiente para que a velocidade medida corresponda a da enzima de interesse; para isso, é necessário utilizá-la em excesso (CORNISH-BOWDEN, 1995).

Como nenhum dos produtos da reação catalisada pela NadE pode ser monitorado facilmente, a enzima Álcool Desidrogenase foi utilizada como auxiliar. Ela utiliza elétrons do etanol para reduzir o NAD, produzido pela NadE, a NADH, que pode ser detectado em 340 nm.

Os sistemas de reação foram preparados e distribuídos em placas de 96 poços e as reações disparadas com um dos substratos de forma automática logo a seguir. As medidas de absorvância foram realizadas continuamente com intervalos de tempo fixos. O intervalo em que a reação foi linear foi considerado para a determinação da velocidade inicial.

6.5.1. Curva padrão

Nos experimentos de atividade enzimática as concentrações de NADH produzidas foram utilizadas para determinar indiretamente a síntese de NAD. Para a determinação das concentrações de NADH os dados obtidos em absorvância foram convertidos em dados de concentração usando a equação obtida a partir de uma regressão linear da curva padrão indicada na figura 14.

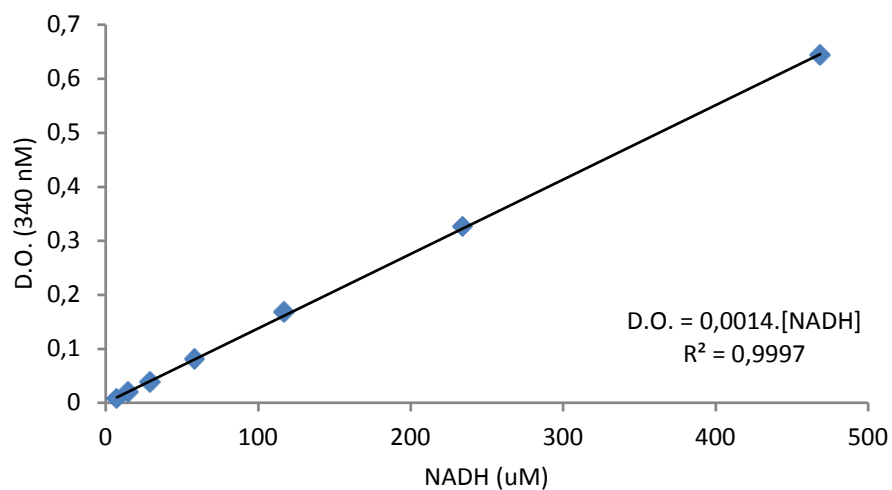


Figura 14– Curva padrão de NADH. Aumento linear da D.O. (340 nm) em função do aumento da concentração de NADH, entre 10 e 500 uM.

6.5.2. Concentração de ADH como fator limitante na determinação da atividade de NadE1

Para determinar a relação entre as enzimas Álcool Desidrogenase e NAD sintetase a ser utilizada nas reações, a proporção de Álcool Desidrogenase foi variada e a concentração de NadE1 mantida constante (Figura 15). A partir de aproximadamente 24000 unidades de álcool desidrogenase para cada unidade de NadE1 não houve mais aumento na velocidade inicial, indicando que a segunda enzima não era mais limitante.

Limitação de ADH sobre Vo de NadE1

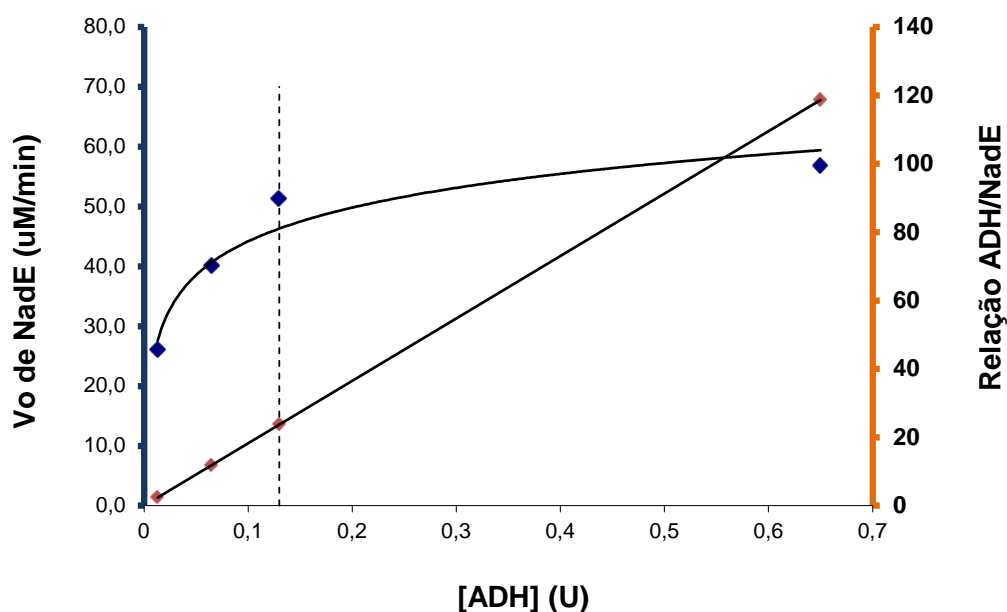


Figura 15 – Limitação de ADH na determinação da velocidade inicial de NadE1. A linha tracejada indica quantidade de álcool desidrogenase utilizada a partir da qual não houve limitação na velocidade inicial de NadE1; ela cruza a linha que mostra a relação entre ADH e NadE, que é de 24 neste momento, sendo 0,13 U de Álcool Desidrogenase e 5,1 mU de NadE1.

Tendo sido estabelecida a relação ADH/NadE1 mínima necessária para que a atividade medida corresponda aquela catalisada por NadE1, uma curva variando as concentrações de NadE1 (entre 0 e 9,6 mU) e fixando a de álcool desidrogenase em 6 U foi obtida (Figura 16). O aumento da velocidade inicial foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de NadE1.

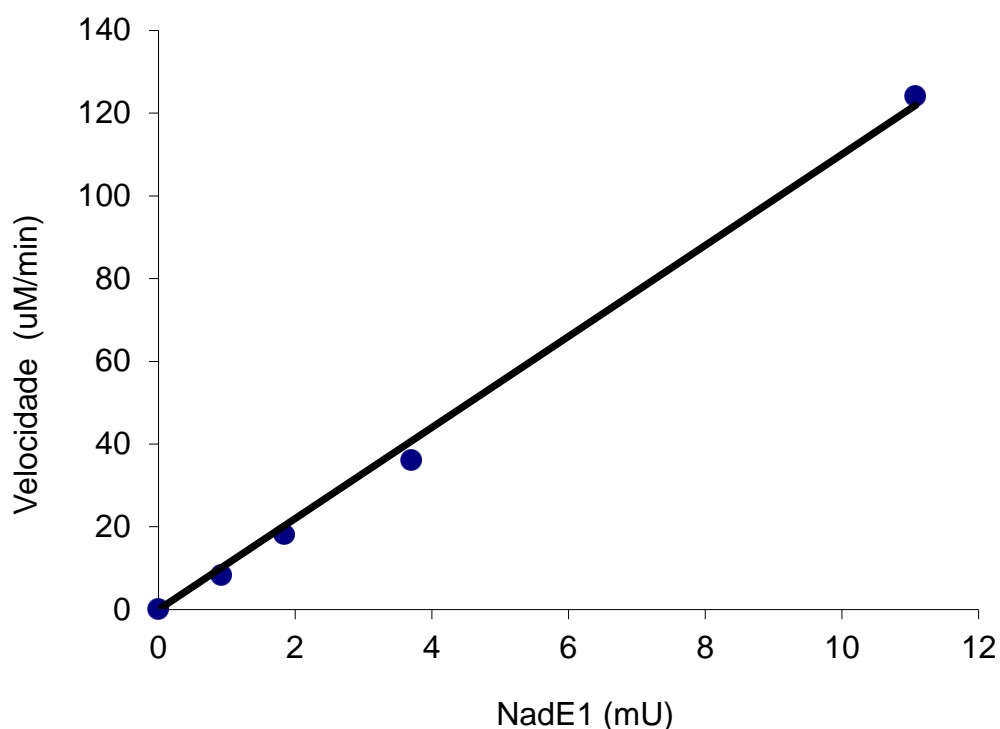


Figura 16 – Velocidade inicial de NadE1 em função da quantidade de enzima. O aumento na concentração de enzima provocou um aumento proporcional na velocidade detectada em uM/min. Foram testadas entre 1 e 10 mU de NadE1 e a velocidade de formação de NADH detectada em uM/min.

6.5.3. Efeito do DTT na atividade de NadE1

Devido ao grande número de cisteínas nas NAD sintetases, 13 por subunidade de NadE1 e 15 por subunidade de NadE2, a presença de um agente redutor poderia afetar a atividade destas enzimas. O uso do DTT a 10 mM adicionado ao sistema de reação promoveu um aumento de 8 vezes na atividade de NadE1 (Tabela 7).

TABELA 7 – EFEITO DO DITIOTREITOL NA ATIVIDADE DE NadE1.

	DTT (10 mM)	DTT (-)
Atividade de NadE (mU)	0,57075 ± 0,057	0,0705 ± 0,007

Utilizando o DTT a atividade específica de NadE1 foi de 600 mU/mg e 1746 mU/mg, usando como substratos a glutamina e a amônia respectivamente; sendo que uma unidade foi considerada como a quantidade de enzima capaz de produzir um umol de NAD por minuto.

NadE2 não apresentou atividade de NAD sintetase *in vitro*. Ao contrário de *nadE1*, o gene de *nadE2* clonado não foi seqüenciado; então, não se sabe se o gene foi clonado sem mutações, o que pode ocorrer durante o processo de clonagem.

6.5.4. Efeito da proteína GlnB sobre a atividade de NadE1

Até o presente trabalho a relação funcional entre GlnB e NadE não havia sido testada. A proteína GlnB, na forma uridililada (fornecida gentilmente pela Profa. Dra. Ana Claudia Bonatto, do Departamento de Genética – UFPR) ou desuridililada (Laskoski, 2007) foi adicionada ao sistema de reação para analisar o possível efeito regulatório desta proteína sobre a atividade de NadE1. Foi obtida uma curva variando as concentrações de GlnB livre ou GlnB totalmente uridililada, de 0 a 300 nmol/L, mantendo NadE1 em 75 nmol/L; as concentrações foram calculadas tendo como base unidades monoméricas. Não foi observada variação na atividade de NadE1 com o aumento nas concentrações de GlnB, nem de GlnB-U. (Figura 17). A presença de moléculas efetoras alostéricas de GlnB como ADP e α -cetogluturato ou variações nas concentrações de ATP poderiam influenciar um possível efeito regulatório de GlnB sobre NadE1. No entanto, estes efetores não foram testados. Além disso, neste experimento foi utilizada como fonte doadora de grupamento amino a amônia; a utilização da glutamina como substrato também poderia influenciar o resultado, mas foi testada apenas em um experimento preliminar, onde não houve alteração na atividade de NadE1.

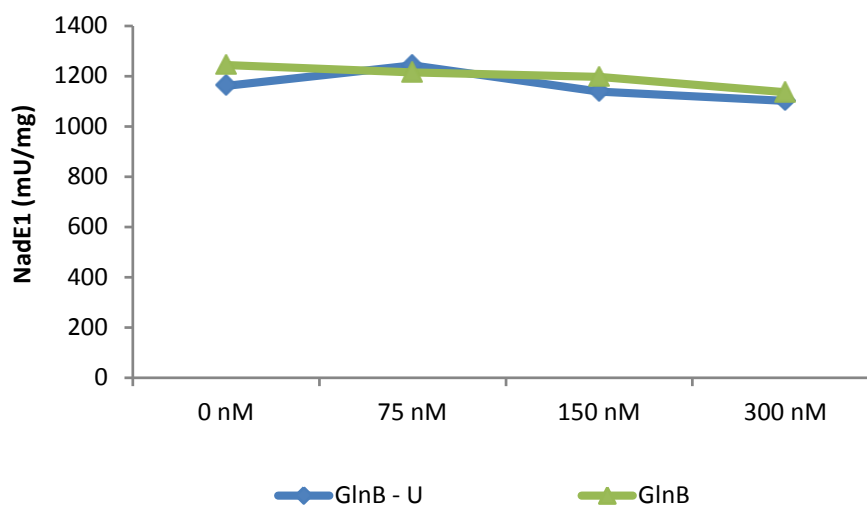


Figura 17 – Efeito de GlnB sobre a atividade de NadE1 (75 nmol/L). GlnB-UMP (azul) e GlnB (verde) foram utilizadas nas concentrações de 0, 75, 150 e 300 nmol/L. A atividade de NadE1 foi dada em mU/mg.

6.5.5. Cinética

Para a determinação do K_M aparente de NadE1 foram inicialmente realizados ensaios de atividade utilizando uma gama de concentrações para cada substrato afim de estimar as faixas de concentração mais adequadas para determinação de parâmetros cinéticos. Foram medidas as velocidades iniciais para cada concentração de substrato dentro de uma faixa entre 0,2 e 10 vezes o valor do K_M ; (CORNISH-BOWDEN, 1995) com exceção do NaAD, devido à limitação na sensibilidade de detecção do sistema de reação em concentrações abaixo de 10 $\mu\text{mol/L}$ de NADH.

Para cada substrato variado os demais substratos foram mantidos em concentrações saturantes, baseando-se nas constantes cinética de NAD sintetases já caracterizadas (TABELA 8). Os resultados de velocidade inicial e de concentração de substrato foram plotados em dois tipos de gráfico, as linearizações de Hanes-Woolf e de Eadie-Hofstee. A primeira foi escolhida para a determinação do K_M ao invés da linearização de Lineweaver-Burk, por apresentar resultados mais confiáveis segundo CORNISH-BOWDEN (1995). A linearização de Eadie-Hofstee evidencia a faixa de concentrações de substratos escolhida; idealmente os pontos devem estar bem distribuídos entre os eixos das abscissas e das ordenadas. As figuras 18, 19 e 20 e 21

mostram estas linearizações utilizando como substratos variáveis o ATP, a glutamina a amônia e o NaAD.

A partir da linearização de Hanes-Woolf foram determinadas as constantes cinéticas para os substratos de NadE1, listados na tabela 8; para a determinação do K_M para a glutamina foram realizados cinco experimentos independentes, para a amônia quatro e para o NaAD e o ATP, dois.

Os resultados de cinética obtidos para a NAD sintetase de *H. seropedicae* são semelhantes aos encontrados na literatura (TABELA 8). O K_M aparente para o ATP é semelhante ao encontrado em *M. tuberculosis*, no trabalho mais recente, 131 ± 37 e 120 ± 30 , respectivamente. Com relação aos substratos glutamina e NaAD, os resultados se assemelharam aos encontrados em *Thermotoga maritima*. Para a amônia o K_M de NadE1 se aproximou do encontrado em *Saccharomyces cerevisiae*.

TABELA 8 – CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES DE NAD SINTETASES DEPENDENTES DE GLUTAMINA USANDO COMO SUBSTRATOS O ATP, O NaAD, A GLUTAMINA E A AMÔNIA

K_M (uM)				Organismo
ATP	Glutamina	Amônia	NaAD	
95 ± 8	420 ± 50	330 ± 100	21 ± 2	<i>Thermotoga maritima</i> (GERRATANA, YAFFE e RESTO, 2009)
120 ±30	1300 ± 100	20000 ± 2000	130 ± 20	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (LARONDE-LEBLANC, RESTO e GERRATANA, 2009)
790	1600	2500	520	* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (BELLINZONI et al., 2002)
170	5300	6400	190	* <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Yu e Dietrich, 1972)
131 ± 37	365,5 ± 85	5442,7 ± 610	9,5 ± 8	* <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (este trabalho)

*Ensaio acoplado contínuo.

Dentre os substratos analisados o NaAD causou inibição nas concentrações acima de 500 umol/L, (Figura 21 A e C); a medida que as concentrações de substrato aumentam a partir de 500 umol/L a velocidade inicial diminui gradativamente resultando em gráficos característicos. O gráfico de $S_0 \times V_0$ (Figura 21 C), por exemplo, mostra um

declínio no platô em concentrações de substrato mais altas; em linearizações como Eadie-Hofstee ou Hanes-Woolf foi verificada a perda da linearidade (Figura 21 A e B).

Por se tratar de um tipo de inibição em que o inibidor, no caso, uma molécula adicional de substrato, se liga apenas quando o substrato encontra-se ligado à enzima, ocorre um fenômeno semelhante ao observado na inibição incompetitiva (CORNISH-BOWDEN, 1995).

Devido à limitação imposta pela metodologia adotada e também pela inibição detectada a determinação da constante cinética para o NaAD foi prejudicada. CORNISH-BOWDEN (1995) recomenda a utilização de concentrações de substrato que estejam entre 20% e 10 vezes o valor do K_M . A medida que as condições experimentais se aproximam das ideais ocorrem variações nos resultados obtidos. Como as concentrações mais baixas de substrato utilizadas para a determinação do K_M para o NaAD ficaram acima do próprio K_M é possível que o real valor do K_M aparente seja, de fato, diferente do encontrado. A presença do efeito inibitório também constitui um fator limitante, porque a curva adota uma conformação que não é mais descrita pela equação; e o valor do K_M é obtido a partir da equação produzida com os dados da curva.

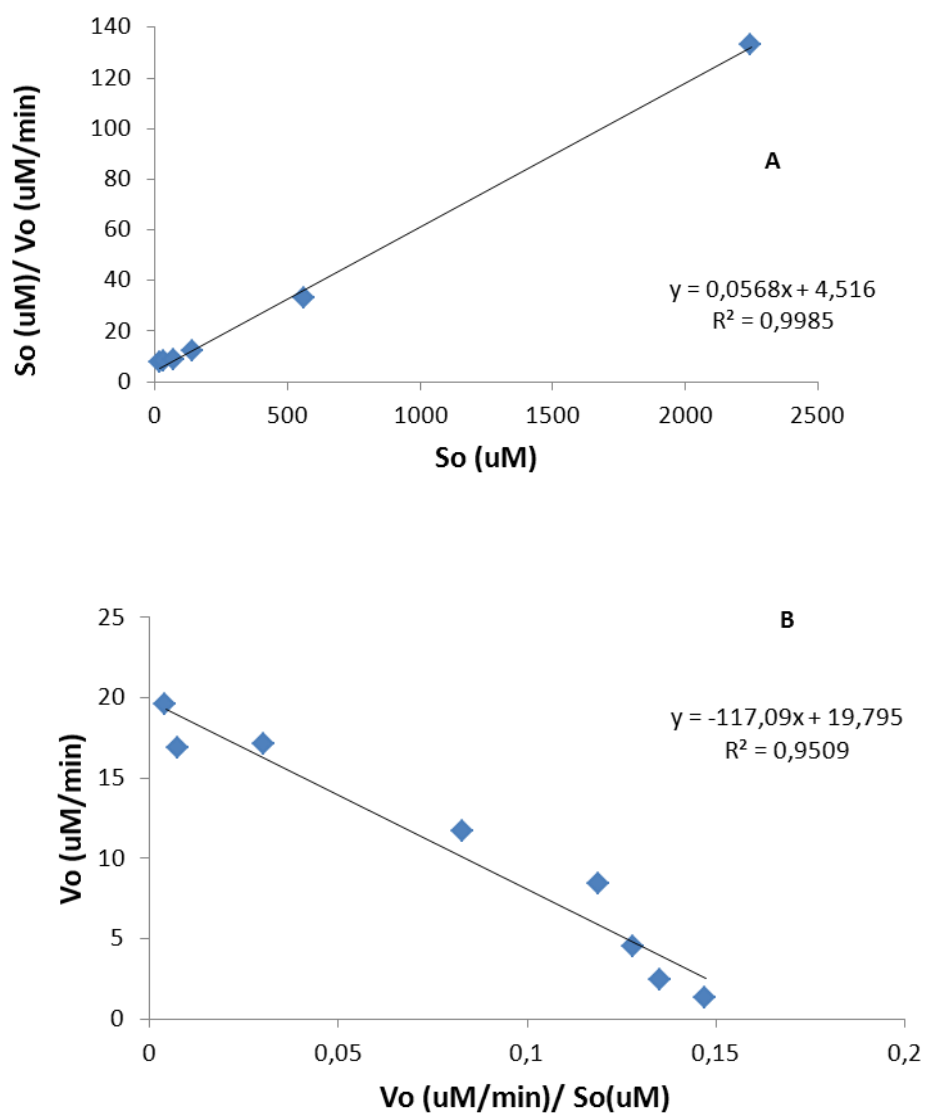


Figura 18 – Gráficos cinéticos utilizando como substrato o ATP. Linearização de Hanes-Woolf (A) e de Eadie-Hofstee (B) utilizando o ATP como substrato. Foram utilizadas concentrações de ATP entre 8 e 4500 uM para a determinação da velocidade inicial; as concentrações dos demais substratos permaneceram constantes e saturantes: NaAD (1 mM) e glutamina (10 mM).

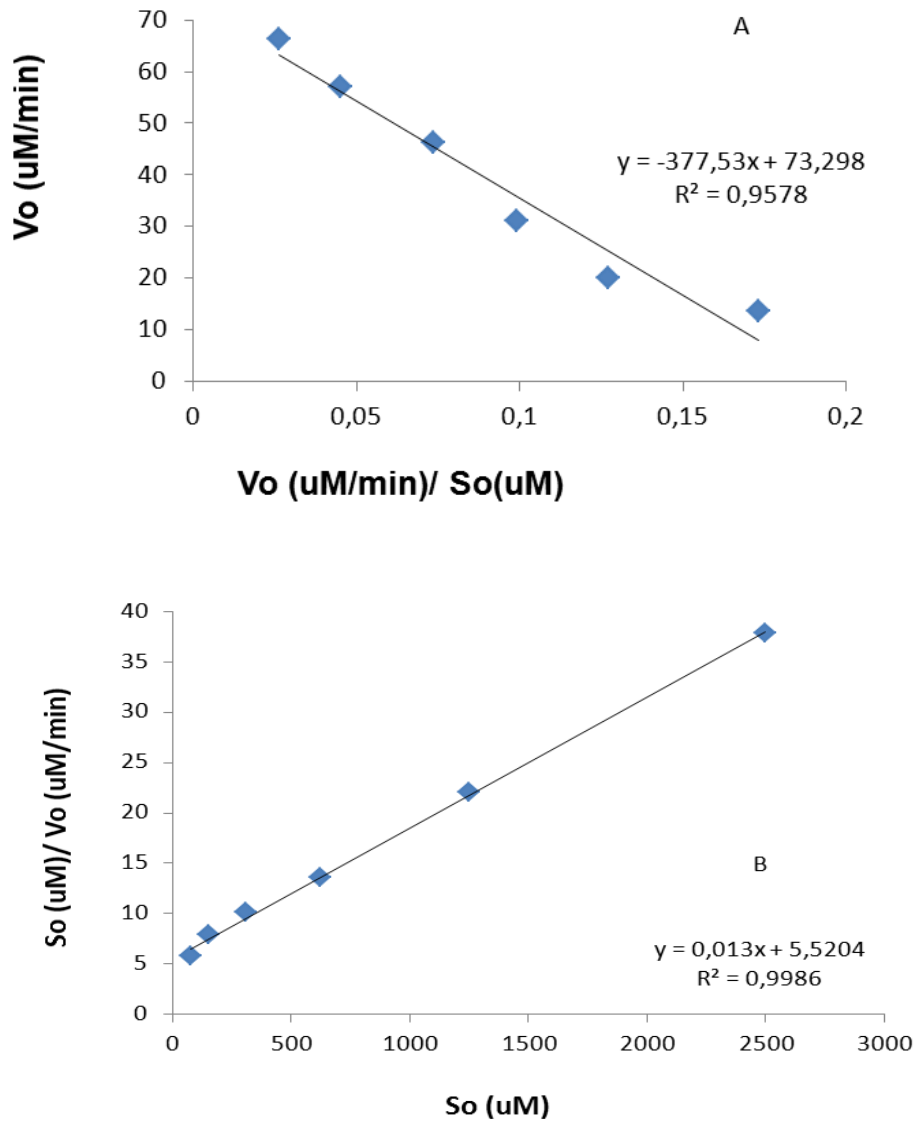


Figura 19 – Gráficos cinéticos utilizando como substrato a Glutamina. Linearização de Eadie-Hofstee (A) e de Hanes-Woolf (B) utilizando a glutamina como substrato em concentração entre 39 e 2500 uM. As concentrações dos demais substratos permaneceram constantes e saturantes: NaAD (1 mM) e ATP (10 mM).

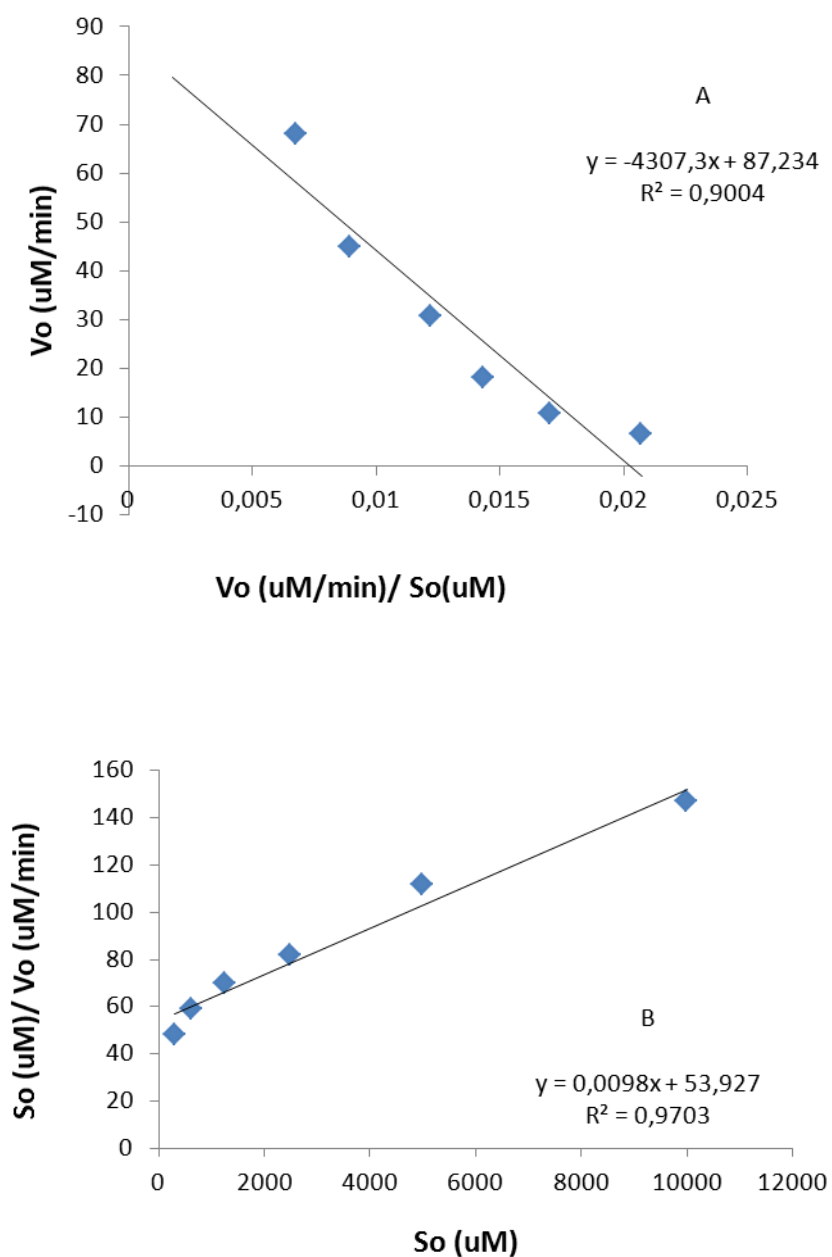


Figura 20 – Gráficos cinéticos utilizando como substrato a Amônia. Linearização de Eadie-Hofstee (A) e de Hanes-Woolf (B); as concentrações de amônia utilizadas foram entre 312 e 10000 uM. As concentrações dos demais substratos permaneceram constantes e saturantes: NaAD (1 mM) e ATP (10 mM).

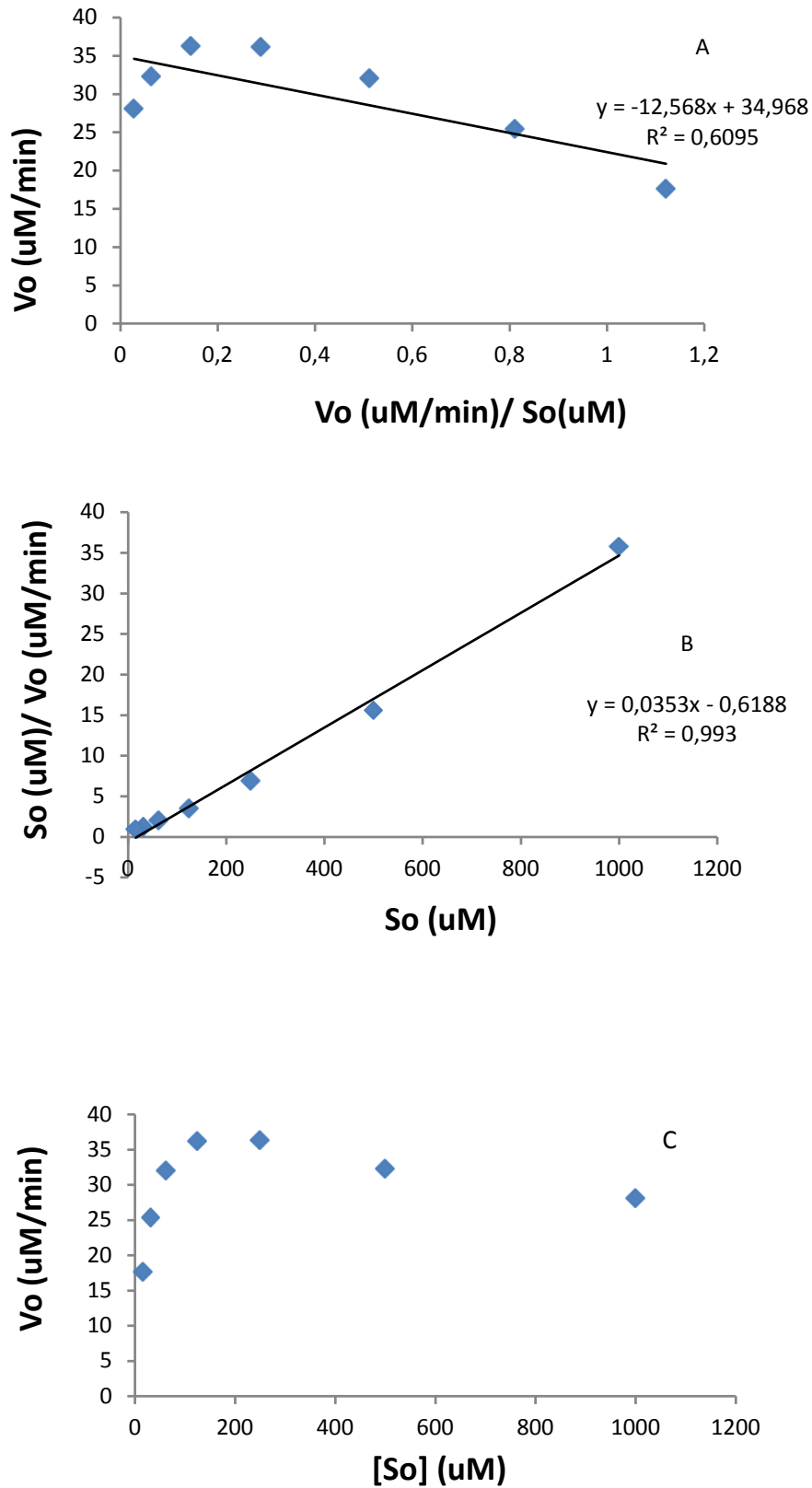


Figura 21 – Gráficos cinéticos utilizando como substrato o NaAD. Linearização de Eadie-Hofstee (A) e de Hanes-Woolf (B) e gráfico direto (C) variando as concentrações de NaAD (entre 15 e 1000 uM) para a determinação do k_m ; as concentrações dos demais substratos permaneceram constantes e saturantes: ATP (10 mM) e glutamina (10 mM) em (C) é possível verificar a redução nas velocidades iniciais utilizando as concentrações de substrato maiores.

As concentrações intracelulares dos metabólitos determinam os valores de K_M das enzimas. Em *E. coli* a maior parte dos metabólitos encontram-se em concentrações próximas aos resultados de K_M para enzimas que utilizam estes metabólitos como substratos (RABINOWITZ et al., 2009). Se em *H. seropediceae* a concentração de glutamina também for semelhante a encontrada em *E. coli* (3,8 mmol/L), o K_M para a glutamina (365 $\mu\text{mol/L}$), segue padrão semelhante ao encontrado em *E. coli*. Neste mesmo organismo, das enzimas que utilizam ATP como substrato, nenhuma apresentou como K_M valor igual ou maior que as concentrações deste metabólito. A maior parte dos K_M para este substrato variaram entre, aproximadamente, 10 e 1000 vezes menores que a concentração intracelular do mesmo (RABINOWITZ et al., 2009). Se em *Herbaspirillum seropedicae* o ATP for encontrado nesta concentração, o K_M para o ATP não foge a este padrão.

Em enzimas com substratos que competem por um único sítio ativo a relação entre as constantes de especificidade indicam, fornecendo as mesmas concentrações de cada substrato, quantas vezes um substrato é consumido com relação ao outro (MITCHELL, 2008). Por exemplo, se NadE1 funcionasse segundo esse padrão NadE1 utilizaria a glutamina 8,74 vezes mais rápido que a amônia, dada pela relação k_{cat}/K_M da glutamina e do k_{cat}/K_M da Amônia: $8,15 \pm 1,53 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1} / 0,932219 \pm 0,014 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Matematicamente esta relação leva em conta a competição pelo mesmo sítio ativo da enzima, de forma que um dos substratos atua como inibidor competitivo de outro (MITCHELL, 2008). No caso da NadE1, cada substrato atua em domínios diferentes da enzima e, ainda se a ativação de uma subunidade induzir a modificação da atividade no outro domínio, como ocorre em *M. tuberculosis*, esta relação deve ser entendida com ressalvas.

Desconsiderando possíveis efeitos complicadores, como inibição pelo produto, os resultados das constantes de especificidade poderiam ser cruzados com as concentrações intracelulares dos substratos para se ter uma idéia sobre a especificidade por um dos substratos, que é dada pela seguinte equação:

$$\frac{v_{oA}}{v_{oB}} = \frac{k_{\text{specificidadeA}}[A]}{k_{\text{specificidadeB}}[B]}$$

amônia é limitada, devido às limitações técnicas para medir as concentrações intracelulares do último substrato. No entanto, tomando a concentração intracelular de glutamina em *E. coli* e relacionando-a com as constantes de especificidade para a glutamina e para a amônia, seria necessário que a concentração intracelular de amônia

fosse maior que 33,3 mmol/L para que NadE1 utilizasse preferencialmente esse substrato como fonte doadora de grupo amino. Mas, dos 103 metabólitos medidos em *E. coli* apenas 3 estavam em concentrações maiores que 10 mmol/L (RABINOWITZ et al., 2009).

Tendo em vista a presença do domínio glutaminase e a constante de especificidade maior para a glutamina, NadE1 utiliza preferencialmente este substrato à amônia.

6.6. ANÁLISES DE SEQÜÊNCIA

Neste tópico todos os aminoácidos numerados têm como referência a NAD sintetase de *M. tuberculosis*.

Comparações entre seqüências de aminoácidos revelou que a enzima NadE1 é mais semelhante à NAD sintetase de *M. tuberculosis* do que a segunda NAD sintetase identificada em *H. seropedicae*, NadE2; foi encontrado 52 % de identidade entre as duas primeiras, enquanto NadE1 e NadE2 apresentaram 24 % de identidade entre si. Por sua vez, a enzima NadE2 apresentou 37% de identidade com a NAD sintetase de *Thermotoga maritima*, enzima do grupo com menor eficiência de sincronismo entre as regiões sintetase e glutaminase.

Como pode ser observado na figura 22 as enzimas NadE1 e NadE2 de *H. seropedicae* apresentam os aminoácidos da tríade catalítica responsáveis pela hidrólise de glutamina. Isso era esperado para o correto funcionamento do domínio glutaminase, característico das NAD sintetases dependentes de glutamina.

Dentre os vinte aminoácidos conservados no túnel de amônia definidos por LaRonde-LeBlanc et al. (2009), NadE1 apresentou dezenove; uma arginina, aparece no lugar da lisina 209, que tem característica semelhante (esta mesma alteração foi encontrada nas outras NAD sintetases analisadas na figura 22). Isso reforça a semelhança entre a NadE1 e a NAD sintetase de *M. tuberculosis*. Dos aminoácidos do túnel de amônia, NadE2 apresentou 10 e a NadE de *T. maritima* apresentou 14. No entanto, em NadE2 quatro destes aminoácidos têm características semelhantes aos aminoácidos conservados. Os resíduos do túnel de amônia de NadE2 que são diferentes dos conservados são os seguintes, baseadas na numeração da NadE de *M. tuberculosis*: glutamato 132 por aspartato, arginina 209 por lisina, lisina 644 por arginina e arginina 658 por glutamina. Na NAD sintetase de *T. maritima* foi encontrada apenas uma substituição deste tipo – no lugar da arginina 209 encontrada em *M. tuberculosis* aparece uma lisina. No total, NadE1 apresenta o mesmo número de aminoácidos ao menos semelhantes (sendo 19 idênticos) aos encontrados no túnel de amônia na NadE de *M. tuberculosis*. Já na NadE2 e na NadE de *T. maritima* este número é igual a 14 e 15, respectivamente (sendo 10 e 14 idênticos). Este resultado não explica a ausência de atividade de NadE2, já que ela apresentou um perfil de

aminoácidos semelhante ao encontrado nesta região na NAD sintetase de *T. maritima*, que já teve atividade caracterizada.

Terminando o túnel de amônia encontra-se o resíduo de aspartato 497. Este aminoácido é a última interação de hidrogênio da amônia antes da síntese do NAD ou o responsável pela conversão do íon amônio em amônia. Ele foi encontrado em todas as NAD sintetases analisadas (Figura 22).

LaRonde-LeBlanc et al. (2009) mostraram que a troca do aspartato 656 por uma alanina em *M. tuberculosis* resultou na redução da capacidade de canalizar a amônia para o domínio sintetase e de sincronizar as atividades dos domínios glutaminase e sintetase. Gerratana et al. (2009), ao classificar as NAD sintetases dependentes de glutamina destacou o contato entre o resíduo de aspartato 656 e glutamato 129, a presença prolina 640 e das leucinas 486 e 639, da segunda constrição hidrofóbica, e a combinação de dois aminoácidos da alça YRE: o glutamato 129 e a fenilalanina 130. No grupo A, com especificidade para a glutamina e alta capacidade de sincronização e canalização da amônia, os resíduos de glutamato 129 e fenilalanina 130 mostraram-se conservados, bem como os aminoácidos da segunda constrição hidrofóbica citados acima. Neste grupo, o Glutamato 129 contacta o Aspartato 656, contribuindo com o sinergismo entre os domínios glutaminase e sintetase; estes resíduos, com exceção da leucina 639, são encontrados na NadE1 (Figura 22). Esses resultados confirmam resultados de cinética, que mostram que NadE1 também tem especificidade para a glutamina como substrato doador de grupo amino, o que também é característico de NAD sintetases do grupo A.

O grupo C contém enzimas de NAD sintetases com baixa capacidade de sincronismo e que não tem especificidade para nenhum dos substratos doadores de grupamento amino. Este grupo é caracterizado pela conservação do aminoácido fenilalanina 130. NadE2, além da alta similaridade de seqüência com uma NAD sintetase deste grupo, também tem este resíduo. NadE2 ainda apresenta uma glicina ao invés de um aspartato na posição 656. Assim como na NAD sintetase de *T. maritima*, a posição 129 da NadE2 é ocupada por uma valina. Em *T. maritima*, a presença da valina reduz o potencial iônico da interação com o resíduo 656, o que resulta em baixa eficiência de canalização de amônia e baixa ativação do domínio glutaminase em resposta a atividade sintetase (GERRATANA, YAFFE e RESTO, 2009). Na enzima NadE2 a presença de aminoácidos apolares (valina e glicina) nas posições ocupadas pelos dois resíduos polares presentes nas enzimas do grupo A,

mencionados acima, pode significar uma alteração na capacidade de sincronizar as atividades dos dois domínios.

Como representante do grupo B, com especificidade para a glutamina como substrato doador de grupo amino, mas com eficiência intermediária de sincronismo está indicada a NAD sintetase de *S. cerevisiae* (Figura 22). Este grupo é caracterizado pela conservação do resíduo de glutamato 129, sem a fenilalanina 130. Nota-se também a ausência do aspartato 656 nesta enzima.

Outra parte da estrutura que pode contribuir com a sinergia interdomínios é a α -hélice 9, que contém os aminoácidos glicina 350 e arginina 354 (que contatam o resíduo 641, que fica próximo a aminoácidos da segunda constrição hidrofóbica) em *M. tuberculosis*. Essa configuração atua como estrutura de comunicação entre os domínios glutaminase e sintetase na NadE deste organismo (LARONDE-LEBLANC, RESTO e GERRATANA, 2009). Na região do prolongamento desta α -hélice apenas a NadE1 apresenta padrão de aminoácidos semelhante ao encontrado na NAD sintetase de *M. tuberculosis*. NadE1 também apresenta a asparagina 641, mas apenas um dos dois resíduos que fazem contato entre este aminoácido e a α -hélice 9 encontrados em *M. tuberculosis*, a arginina 354. Já NadE2 apresenta a glicina 350, mas não apresenta a Arginina 354 e também aparentemente não apresenta a mesma densidade de aminoácidos encontrada na NadE de *M. tuberculosis* e na NadE1, nem a asparagina 641. A relevância deste resultado deve ser avaliada analisando as atividades glutaminase e sintetase de NadE1 e de NadE2 e/ou com a resolução da estrutura destas enzimas, ou de outras enzimas dos seus respectivos grupos.

Na região de ligação do ATP em NadE2 chama atenção a presença de um resíduo de serina (polar e com índice de hidrofobicidade igual a -0,8) onde normalmente encontra-se ou uma valina (resíduo 367 em *M. tuberculosis*), uma isoleucina ou uma leucina (todos apolares e com índices de hidrofobicidade maiores que 3,8). Alinhando-se doze NAD sintetases de organismos distantes filogeneticamente, sendo três de eucariotos e o restante procariotos dos grupos A e C da classificação de Gerratana et al. (2009), todas apresentaram uma leucina ou uma valina, com exceção de NadE2. Este mesmo resíduo em NAD sintetases dependentes de amônia pode ser ocupado por uma isoleucina. A estrutura cristalográfica da NAD sintetase de *E. coli* mostrou que o AMP-adenililado ocupa uma região homóloga contendo os aminoácidos glicina, isoleucina e serina. Nesta enzima, o AMP adenililado interage com os resíduos de isoleucina e serina deste sítio e com uma arginina,

destacada na figura 22 como o aminoácido 461 de *M. tuberculosis*. Talvez, este aminoácido, juntamente com aqueles que não são idênticos aos encontrados no túnel de amônia de *M. tuberculosis*, tenham provocado mudanças sutis, mas suficientes para resultar em uma enzima com atividade que não seja de NAD sintetase. Wahl et al. (2005) cristalizou a NAD sintetase de *E. coli* com seus substratos e indicou sítios de ligação do ATP e do NaAD. No entanto, a análise dos sítios de ligação do NaAD não mostrou nenhuma característica restrita a NadE2 que indique algum prejuízo a ligação desses substratos (Figura 22), o que evidenciaria uma perda de atividade sintetase. Isoladamente, a serina 305 de NadE2 pode não ser suficiente para impedir a ligação do ATP e abolir a atividade sintetase. Mas a presença desse aminoácido pode resultar em uma alteração da afinidade pelo ATP. Duas enzimas com funções iguais mas com K_M diferentes podem ser uma forma manter a síntese de NAD mesmo com flutuações nas concentrações dos substratos.

Uma nova atividade adquirida por NadE2 acompanhada de uma nova estrutura, baseando-se na organização monomérica da enzima obtida por gel filtração poderia justificar a falta de atividade NAD sintetase. A estrutura de *M. tuberculosis* mostra duas hélices que não estão presentes nas NAD sintetases dependentes de amônia e que são necessárias para a organização oligomérica: a α -hélice 18 e a α -hélice 20. No entanto, a sequência de NadE2 alinhou-se tão mal as regiões destas hélices das sequências de NadE1 e da NadE de *M. tuberculosis* quanto a sequência da NadE de *T. maritima* o fez; NadE2 e a NAD sintetase de *T. maritima* também não apresentaram a densidade de aminoácidos presente na α -hélice 20 de *M. tuberculosis* (figura 22). O trabalho de Gerratana et al. (2009) não menciona nada sobre a estrutura quaternária da NAD sintetase de *T. maritima* nos resultados dos experimentos de gel filtração.

A sequência de NadE2 disponível no genoma de *H. seropediceae* não apresenta substituições de aminoácidos que possam justificar a ausência de atividade relatada neste trabalho, pois esta enzima é muito semelhante a outra NAD sintetase já caracterizada e parece apresentar os elementos necessários para seu funcionamento. O sequenciamento do gene clonado pode auxiliar a verificar se houve alguma mutação durante a clonagem.

Com os experimentos de cinética descritos neste trabalho foi possível determinar a especificidade de substrato de NadE1. No entanto, para corroborar as classificações de NadE1 e de NadE2 nos grupos A e C com relação a capacidade de

sincronização dos domínios glutaminase e sintetase seria necessário utilizar experimentos medindo a atividade glutaminase e sintetase em ensaios acoplados descontínuos, como os usados para caracterizar as NadE de *M. tuberculosis* e *T. maritima*. Assim, poderiam ser comparadas as atividades dos dois domínios isoladamente e como a atividade de cada domínio poderia influenciar na atividade do outro. Desta forma seriam produzidos resultados experimentais de outros representantes de NAD sintetases da classificação de Gerratana et al. (2009), que previu os padrões cinéticos dos grupos A, B e C baseando-se no perfil cinético de apenas uma representante de cada um destes grupos e em análises de sequência de 37 enzimas. Esta caracterização funcional também poderia ser útil para determinar e compreender os motivos da co-existência dessas duas enzimas em *H. seropediceae*.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 1 MN--FYSAYQHGFVVAACHHTTIGDPAANAASVLDMARACHDDGAALA 48
NadE1 H. s 1 MQSPFFNLYSHGFARVAVAVPDKVADPGFNAQRTIALAEQAAARGAVLV 50
NadE2 H. s 1 -----MLRIAIAQCNPITIGDFEGNLALHLDGLQRAAQAGADLV 38
T. maritim 1 -----MKRLRVTLAQLNPTLGD FEGNLKKAIEALRVAEDRGSDDL 40
S. cerevis 1 -----MSHLITLATCNLNQWALDFEGNRDRILQSIKIAKERGARLR 41

```

```

...*|...*|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 49 VFPELTLISGYSIEDVLLQDSLLDAVEDALLDLVTESADLLPVLVVGAPLR 98
NadE1 H. s 51 SFPELGLSAYSCEDLFQQRALLDASLQALQSVLEASMRI PAALIVGLPLK 100
NadE2 H. s 39 VFPELSICGYYPGDLLEEARFLDRAEATLQDVIDATRRLPGLTAVIGAPR 88
T. maritim 41 VFPELFLPGYPPEDLMLRLSFLRENRYKYLQKFAQHTRNL-GVTVLMGFID 89
S. cerevis 42 VGPELEITGYGCLDHFLENDVCLHSWEMYAQI IKNKETHGLILDITGMPVL 91

```

Alça YRE

```

.....|*|.....|.....|.....|.....|.....|*|.....|*|*|*|.....|.....|
M. tubercu 99 HRHRIYN-----TAVVIHRGAVLGVVPKSYLPTYREFYERRQMAPGDGER 143
NadE1 H. s 101 VDHQLYN-----CAVVLHHGRILGVVPKSYLPNYSEFYEARQFSSADCAV 145
NadE2 H. s 89 RNP GP GKPLFTMP LLA VREGRIVA EYHKQLLPVYGVEDDGRHF EAGP--- 135
T. maritim 90 SDEDAYN-----AAAVVKDGEILGVYRKISLPNYGVEDERRYFKPG---- 130
S. cerevis 92 HKNVRYN-----CRLLSLDGEILFIRPKIWLGN YREMRFFTPWMKPGVVE 136

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 144 G-TIRIGGADVAFGTDLLFAASDLP--GFVLHVEICEDMFVP-----M 183
NadE1 H. s 146 TRSVHLLGQEVGFGSHLLFEIRNIP--DFRFHIEICEDVWVP-----I 186
NadE2 H. s 135 -----ETACVLPLK--GMRVGFLICEDGWNDLRSYRVN 167
T. maritim 130 -----EELLVVKIG--NIKVGVTICEDIWNP-----VE 156
S. cerevis 137 DFILPPEIQKVTGQRLVFPFGDAVINSLDTCIGTETCEELFTP-----Q 179

```

```

.....|.....|.....|.....|*|.....|*|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 184 PPSAEAAALAGATVLANLSGSPITIGRAEDRLLARSASARCLAAYVYAAA 233
NadE1 H. s 187 PPSSFAALAGATVLVNLSASNIVVGKSGYRHQLVVSQQSARCLAAYLYSSA 236
NadE2 H. s 168 PFEKLAQAD-AQLVVSINASPSDVGKRSQRHALFQAACLRRQ MALLYVNQ 216
T. maritim 157 PSASLSLGEGVHLIANLSASPYHVGKPVLRKDYL S MKAYDYHVAMAYCNM 206
S. cerevis 180 SPHIAMSLDGEIMTNSSGSHHELRLKLNKRLDLILNATKRCGGVYLYANQ 229

```

```

.....|*|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 234 GEGESTTDLAWDGQTMIWENGALLAESERFPKGVRRSVADVDTELLRSER 283
NadE1 H. s 237 GNGESTTDLAWDGQALICENGELLAESERFAQCGHVIYADVDLERLSRER 286
NadE2 H. s 217 VGGQ---DQLVYDGGSFAMSP----- 234
T. maritim 207 VGGQ---DELVFDGGSMVVD A-----SGEVINYGKLFEEEIITVDL DLD 247
S. cerevis 230 RGCDGDRLYYDGCALIAINGTIVAQGSQFSLDDVEVV TATVDLEEVR SYR 279

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 284 LRMGTFDDNRRHHRELTESFRRIDFALDPPAG-DIGLLREVERFPFVVPAD 332
NadE1 H. s 287 FHQTTFGQSVRRHADEVRRFEVVGFEVQIPQQQALPLQRRVARFPYVPAN 336
NadE2 H. s 234 --LQGLAFEAAAR---LAEDFQVLAFEGGRFLRS DGVGAPQCIDQTMATPE 279
T. maritim 248 ENLRVSLVDPRRRYMKTQNYPVKTV EAGNLRKESGHFEPV NPLPVREEE 297
S. cerevis 280 AAVMSRGLQASLAEIKFKRIDIPVELALM T SRFDPTVCPTKVREPFYHSP 329
    
```

α-hélice 9



```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 333 PQRLOQDCYEAYNIQVSGLEQRLRALDYPKVVIGVSGGLDSTHALIVAT- 381
NadE1 H. s 337 AEQRELRCREVYSIQVQALVQRLSSAGLKKVIGVSGGLDSTHALLVCA- 385
NadE2 H. s 280 FHRR-----QILLGLRDYARRCGFGKVVVGS SGGIDSAVTIALAA- 319
T. maritim 298 MFR-----ALITGLRDYVRKNGFEKVVIGLSGGMDS SLVAVIAT- 336
S. cerevis 330 EEI IALG-----PACWMDYLRR CNGTGFFLPLSGGIDSCATAMIVHS 372
Prolongamento α-9      ↑      ↑      ooo      Mg++
                          N      ATP
    
```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 381 -----HAM DREGRPRSDILAFALPG----- 401
NadE1 H. s 385 -----KAMDKLGLPRSNILAYTMPG----- 405
NadE2 H. s 319 -----EALGAQ-----NVVAVTMPS----- 334
T. maritim 336 -----EALGKE-----NVKGVLMPS----- 351
S. cerevis 373 MCRLVTDAAQNGNEQVIKDV RKITRSGDDWIPDSPQDLASKIFHSCFMGT 422
    
```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 402 FATGEHTKNNAIKLARALGVTFSEIDIGDTARLMLHTIGH PYSVG----- 446
NadE1 H. s 406 FATSSRTL VQAHQLMAQVGC SAQEIDIRPSC EQMLKDLGHPYSRG----- 450
NadE2 H. s 335 VFSSAGSVSDSETL CQALGVTLFRHP IADLVREFEDGFATAFGA----- 378
T. maritim 352 MYTSKESIEDAQT LAKNLGIETFI IPI TDVFHSYLET LKGVFAG----- 395
S. cerevis 423 ENSSKETRNR AKDLSNAIGSYHVDLKMDSL VSSVVS LFEVATGKKPIYKI 472
    
```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 446 ---EKVYDVTFENVQAGLR TDYLFRIANQR-----GGIVLGTGDL 483
NadE1 H. s 450 ---EPVYDITFENVQAGERTNHLFR LANHH-----GAIVIGTGDL 487
NadE2 H. s 378 ---PLRGLPLENLQARV R GAILMEYSNGY-----DALLITTGNK 414
T. maritim 395 ---REPDITEENLQARIRGN YLMALS NKF-----GWLVLTTG NK 431
S. cerevis 473 FGGSQIENLALQNIQARLR M VLSYLF AQLLPWVRGIPNSGGLLVIG SANV 522
                          N o                          N o
    
```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M. tubercu 484 SELALGWSTYGVGDQMSHYNVNAGVPKTLIQHLIRWVISAGEFGEKVGEV 533
NadE1 H. s 488 SELALGWCTYGVGDHMSHYNVNASVPKTLITHMVRWVAESGSLELKQPEV 537
NadE2 H. s 415 SEISVGYCTL-YGDTNGGLGLIGDLYKTEVYALARHLNAQAGREIIPAAI 463
T. maritim 432 SEMATGYATL-YGMAGGF AVIKDVYKTDVYRIGRWYNSWRGKEIIPENI 480
S. cerevis 523 DECLRGYLTR-YICSSA INPIGGISKTDLKRFIAYASKQYNMPILN-DF 570
Mg++      N NN      N
    
```


7. CONCLUSÕES

NadE2 foi clonada, purificada e sua identidade confirmada por MALDI-TOF.

NadE1 foi purificada na forma ativa e teve sua atividade aumentada em oito vezes com o uso do DTT a 10 mM.

A proteína GlnB não afetou a atividade de NadE1 *in vitro* nas condições testadas.

NadE2 não apresentou atividade de NAD sintetase *in vitro*. Os K_M aparentes de NadE1 para a glutamina, a amônia, o ATP e o NaAD são 365, 5443, 131 e 9,7 μ M, respectivamente.

Os dados cinéticos e a análise de sequência sugerem que NadE1 utiliza glutamina como doador de grupo amino.

Dados de gel filtração indicam que NadE1 é provavelmente um octâmero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLIBERT, P., J. WILLISON, e P. VIGNAIS. Complementation of nitrogen regulatory (*ntr*-like) mutations in *Rhodobacter capsulatus* by an *E. coli* gene: cloning and sequencing of the gene and characterization of the gene product. **J. Bacteriol.** V. 169, p. 260–271. 1987.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R. e MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol Mol Biol Rev.** 65:80–105, 2001.

BALDANI, JI; BALDANI, VLD; SELDIN, L; DOEBEREINER, J. **International Journal of Systematic Bacteriology.**v. 36, no. 1, p. 86-93. 1986.

BARRY, C. E., BOSHOF, H. I. M.; XU, X.; TAHLAN, K.; DOWD, C. S.; PETHE, K.; CAMACHO, L. R.; HO PARK, T.; YUN, C. S.; SCHNAPPINGER, D.; EHRT, S.; WILLIAMS, K. J. Biosynthesis and Recycling of Nicotinamide Cofactors in *Mycobacterium tuberculosis* AN ESSENTIAL ROLE FOR NAD IN NONREPLICATING BACILLI. **Journal of Biological Chemistry.** v. 283(28). P. 19329–19341, 2008.

BEATTIE, G. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In. GNANAMANICKAM (Ed.). *Plant-Associated Bacteria*. Springer Netherlands, 2006, pag. 1-56.

BEGLEY T. P.; KURNASOV, O.; GORAL, V.; COLABROY, K.; GERDES, S. e ANANTHA, S.; Osterman, A. NAD Biosynthesis: Identification of the Tryptophan to uinolinate Pathway in Bacteria. **Chemistry e Biology.** v. 10, p. 1195–1204, 2003.

BELLINZONI, M.; ROSSI, E. D.; BRANZONI, M.; MILANO, A.; PEVERALI, F. A.; RIZZI, M. e RICCARDIA, G. Heterologous expression, purification, and enzymatic activity of *Mycobacterium tuberculosis* NAD synthetase. **Protein Expression and Purification.** V. 25, p. 547-557, 2002.

BELLINZONI, M.; BURONI, S.; PASCA, M. R.; GUGLIERAME, P.; ARCESI, F.; DE ROSSI, E.; RICCARDI, G.; Glutamine amidotransferase activity of NAD⁺ synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* depends on an amino-terminal nitrilase domain. **Research in microbiology**, 2005.

BENELLI, E.M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.179, p.4623-4626, 1997.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 309–314, 2001.

BONATTO, A. C.; COUTO, G. H. ; SOUZA, E. M.; ARAÚJO, L. M. ; PEDROSA, F. O.; NOINDORF, L. E BENELLI, E. M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**. v. 55, p. 293-299, 2007.

BRENNER, C.; SEIDLE, H. F.; BIEGANOWSKI P. e WOJCIK, M. Glutamine-dependent NAD⁺ Synthetase: how a two-domain, tree-substrate enzyme avoids waste. **J. Biol. Chem**. v. 281, 33395-33402, 2006.

BRENNER, C. Evolution of NAD. *Biosynthetic Enzymes Structure*. v. 13, 2005.

CHENG, W. e ROTH, J. Isolation of NAD Cycle Mutants Defective in Nicotinamide Mononucleotide Deamidase in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p. 6711–6717, 1995.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res** v. 16, p. 6127-6145, 1988.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 5th edition.

FOSTER, J. W. e MOAT, A. G. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Pyridine Nucleotide Cycle Metabolism in Microbial Systems. **Microbiological reviews**. 1980.

GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M. e REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**. V. 161, 238—245, 2006.

HARA, N.; YAMADA K., TERASHIMA, M.; OSAGO, H.; SHIMOYAMA, M.; AND TSUCHIYA, M. Molecular Identification of Human Glutamine- and Amonia-dependent NAD Synthetases carbon-nitrogen hydrolase domanin confers glutamine dependency. **J. Biol. Chem**. 2003.

HUERGO, L. F. **REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM *Azospirillum brasilense***. UFPR, 2006. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica.

HUGHES, K. T.; OLIVERA, B. M.; ROTH, J. R. Structural Gene for NAD Synthetase in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 1988.

HUYNEN, M.; SNEL, B.; LATHE, W.; BORK, P. Predicting Protein Function by Genomic Context: Quantitative Evaluation and Qualitative Inferences. **Genome Research**. 2000.

IMAI, T. Purification and Properties of Nicotinamide Mononucleotide Amidohydrolase from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Biochemistry**. v. 73, p. 139-153, 1973.

IMSANDE, J. Pathway of Diphosphopyridine Nucleotide Biosynthesis in *Escherichia coli*. **Journal of biological Chemistry**. 1961.

KURNASOV, O. V. B.; POLANUYER, M.; ANANTA, S.; SLOUTSKY, R.; TAM, A.; GERDES, S.Y. e OSTERMAN, A. L. Ribosylnicotinamide Kinase Domain of NadR Protein: Identification and Implications in NAD Biosynthesis. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**. Dec, p. 6906–6917, 2002.

LAEMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**. 1970.

LASKOSKI, K. **INTERAÇÃO ENTRE A NAD⁺ SINTETASE (NadE1) E AS PROTEÍNAS PII DE *Herbaspirillum seropedicae***. UFPR, 2007. 53p. Monografia apresentada ao departamento de bioquímica.

LARONDE-LEBLANC, N.; RESTO, M. e GERRATANA, B. Regulation of active site coupling in glutamine dependent NAD⁺ synthetase. **Nature Structural and Molecular Biology**. Vol 16, pag. 421-429, 2009.

JIANG, P. e NINFA, A. J. *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Controlling Nitrogen Assimilation Acts As a Sensor of Adenylate Energy Charge in Vitro. **Biochemistry**. Vol 46, pag. 12979-12996, 2007.

MITCHELL, D. **Cinética enzimática: seção 04 – cinética de inibição reversível**. UFPR, 2008. Apostila da disciplina de cinética enzimática do curso de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica.

NING, Z.; OLIVERA, B. M. e ROTH. J. R. Identification of a Repressor Gene Involved in the Regulation of NAD *De Novo* Biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. **Journal of bacteriology**. p. 117-125, 1988.

NOINDORF, L. **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO OPERON *orf1glnKamtB* E DO GENE *amhH* DE *Herbaspirillum seropedicae***. UFPR, 2007. 157 p. Tese apresentada ao departamento de bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

NOINDORF, L.; REGO, F. G. M.; BAURA, V. A.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; RIGO, L.U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O. e CHUBATSU L. S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch Microbiol**. Vol 185: pag. 55–62, 2006.

PREISS, J. e SPENCER, R. L.; Biosynthesis of Diphosphopyridine Nucleotide The purification and the properties of diphosphopyridine nucleotide from *Escherichia coli*. **Journal of biological chemistry**. v. 242 p. 385-392,1966.

RABINOWITZ, J. D.; BENNETT, B. D.; KIMBALL, E. H.; GAO, M.; OSTERHOUT, R. e J. VAN DIENS. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. **Nature Chemical Biology**. 2009.

GERRATANA, B.; YAFFE, J. e RESTO, M. An ancestral glutamine-dependent NAD⁺ synthetase revealed by poor kinetic synergism. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2009

ROTH J. R.; GROSE, J. H. e BERGTHORSSON, U. Regulation of NAD Synthesis by the Trifunctional NadR Protein of *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**. v. 187, p. 2774–2782, 2005.

ROTH, J. R.; OLIVERA, B. M. e ZHU, N. Identification of a Repressor Gene Involved in the Regulation of NAD *De Novo* Biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. v.170, p. 117-125, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITISCH, E. F. e MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2nded, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SINCLAIR, D. A.; HOWITZ, K. T.; BITTERMAN, K. J.; COHEN, H. Y.; LAMMING, D. W.; LAVU S.; WOOD, J. G.; ZIPKIN, R. E.; CHUNG P.; KISIELEWSKI, A.; ZHANG, L. e SCHERER, B. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**. v. 425, p. 191-196, 2003.

SNEL, B.; LEHMANN, G.; BORK, P. e HUYNEN, M. A. String: a web-server to display and retrieve the repeatedly occurring neighborhood of a gene. **Nucleic acid research**. 2000.

STANCEK, M.; SCHNELL, R. e RYDÉN-AULIN, M. Analysis of *Escherichia coli* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase mutants in vivo and in vitro. **BMC Biochemistry**.

TEZUKA, T. e MURAYAMA Y. Formation of pyridine nucleotides under symbiotic and non-symbiotic conditions between soybean nodules and free-living rhizobia. **Phytochemistry**. v. 61, p. 637–644, 2002.

WANG, Y.; LIN, M.; TIAN, Z.; ELMERICH, C. e NEWTON, W. E. **Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment**. Springer Netherlands. V. 41, 2005.

WAHL, M. C.; HUBER, R.; HUMM, A. e JAUCH, R. Structures of *Eschechichia coli* NAD synthetase with substrates and products reveal mechanistic rearrangements. **The Journal of Biological Chemistry**. Pag. 14131-15139. 2005.

WILLISON, J. Biochemical genetics revisited: the use of mutants to study carbon and nitrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 104, p. 1–38, 1993.

WIMPENNY, J. W. T. e FIRTH, A. Levels of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Facultative Bacteria and the Effect of Oxygen. **J Bacteriol.** V. 111, p. 24–32, 1972.

YU, C.K. e DIETRICH, L.S. Purification and Properties of Yeast Nicotinamide Adenine Dinucleotide Synthetase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 247, p. 4794-4802, 1972.

YU'E, L. e ERDA, L. Emissions of N₂O, NH₃ and NO_x from fuel combustion, industrial processes and the agricultural sectors in China.

ZIEGLER, M.; BERGER, F. e LAU, C. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear NAD biosynthetic enzyme NMN adenylyltransferase 1. **PNAS**. v. 104, p. 3765-3770, 2006.

ZIEGLER, M.; POLLAK, N. e OLLE C. D. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. **Biochem. J.** v. 402, p. 205–218, 2007.

SANT'ANNA, F. H.; TRENTINI, D. B.; WEBER, S. de S.; CECAGNO, R.; SILVA, S. C. e
SCHRANK, I.S. The PII Superfamily Revised: A Novel Group and Evolutionary Insights.