

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIAN ROTUNO MOURE

**Controle da atividade da enzima regulatória dinitrogenase redutase ADP-
ribosiltransferase (DraT) pela proteína GlnB de *Azospirillum brasilense***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel M. de Souza

Co-orientadores: Prof. Dr. Luciano F. Huergo
e Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

CURITIBA

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

VIVIAN ROTUNO MOURE

Controle da atividade da enzima regulatória dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT) pela proteína GlnB de *Azospirillum brasilense*

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica, no programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (Orientador)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profª. Drª. Rose Adele Monteiro

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profª. Drª. Ana Cláudia Bonatto

Departamento de Genética – UFPR



Profª. Drª. Ana Paula Canedo Valente
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ



Prof. Dr. Hernán Terenzi
Departamento de Bioquímica - UFSC

Curitiba, 18 de dezembro de 2012.

Dedico este trabalho ao meu pai,
Adalberto Moure (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido força e perseverança para realização deste trabalho.

A minha família: meu pai, minha mãe e meu irmão por todo amor, apoio e por compreenderem a importância deste trabalho em minha vida. Ao meu marido, Glaucio Valdameri, pelo seu amor, sua incansável paciência e por fazer meu dia-a-dia mais feliz.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza, pelas oportunidades durante todos estes anos e principalmente, pelo seu exemplo de dedicação.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Luciano Huergo e Marcelo Müller pelo apoio, motivação e discussões.

Aos demais professores do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio pela ajuda, motivação e discussões. Principalmente, as professoras Dr^a. Rose Adele Monteiro e Dr^a. Leda Satie Chubatsu pelo acompanhamento do trabalho e relevantes sugestões.

Ao professor Lance Seefeldt por ter me recebido em seu laboratório durante meu doutorado sanduíche, pelo enriquecimento científico e intelectual, pela confiança e oportunidade.

Aos professores Ana Paula Valente e Fábio Almeida e seus alunos pela ajuda, oportunidade e acolhida no CNRMN.

Aos amigos do complexo 275-279 por esses anos de ótima convivência, de tantas conversas intelectuais que tornaram a realização deste trabalho mais fácil.

A todos amigos do grupo de Fixação e aos demais do departamento que me ajudaram direta e indiretamente com metodologias, discussões e mesmo conversas paralelas. Em especial aos meus compadres que são amigos desde o mestrado e agora são orgulhosamente professores Marcelo, Dayane e Doumit.

Aos técnicos Dona Rose, Valter e Dona Marilza. Vocês facilitam grandemente nosso trabalho.

Aos meus mais que colegas de laboratório e departamento, amigos de Logan Zhiyong Yang, Karamatullah Danyal, Shannon Wendroth, Brad Wahlen, Simon Duval, Anna Lytle, Sudipta Shaw, Robert Willis, Alex McCurdy, Nimesh Khadka e Valerie Godfrey que me respeitaram, me ajudaram e estiveram comigo durante 11 meses em um período de grande crescimento científico. Não consegui expressar com palavras a emoção de ter recebido a homenagem de vocês na minha despedida, mas deixo aqui registrada a minha enorme gratidão.

Aos meus amigos que entendem a minha ausência e que permanecem ao meu lado.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFPR e seus professores.

Aos membros da banca examinadora pelas correções, sugestões e discussões.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e CAPES pela bolsa de PDEE (estágio de doutoramento);

A todos que participaram desta etapa da minha vida e que contribuíram para meu crescimento profissional, científico e pessoal.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio é catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase. Este complexo contém duas metaloproteínas: as proteínas Fe e MoFe e sofre modificação pós-traducional. Em *Azospirillum brasilense*, objeto deste estudo, a regulação pós-traducional envolve a modificação covalente de uma das subunidades da proteína Fe por ADP-ribosilação. Esta ADP-ribosilação inativa reversivelmente a proteína Fe e é catalisada pela DraT em resposta ao aumento de íons amônio ou depleção da energia celular. O grupo ADP-ribosil é removido pela DraG, promovendo reativação da proteína Fe e conseqüentemente, da nitrogenase. Além das proteínas DraT e DraG, as proteínas PII estão diretamente envolvidas neste processo de desligamento da nitrogenase. Neste trabalho são apresentados resultados referentes ao controle de DraT exercido pelas proteínas PII. Um protocolo alternativo para a purificação de PII nativas foi desenvolvido com a utilização de um tratamento térmico (80 °C/15 min) anterior a injeção na coluna. Este tratamento térmico melhorou a homogeneidade da GlnB de *A. brasilense* de 70 para 99%. A alta estabilidade térmica foi uma característica comum de proteínas PII de várias Proteobactérias. Os valores de T_m utilizando Sypro Orange foram maiores do que 77 °C. Experimentos ^1H RMN mostraram que a GlnB de *A. brasilense* foi estável até 70 °C. Além disso, experimentos ^1H - ^{15}N TROSY confirmaram que as amostras de GlnB obtidas com e sem a etapa de tratamento térmico mantiveram a mesma conformação global. A partir destes resultados, o protocolo de purificação de proteínas PII de Proteobactérias foi desenvolvido com a utilização de uma etapa de tratamento térmico de 70 °C/15 min anterior a injeção na coluna que promoveu aumento da homogeneidade de 70 para 95%, com maior quantidade de GlnB após cromatografia. Para avaliar o envolvimento de GlnB e GlnZ de *A. brasilense* na regulação de DraT, a proteína Fe de *Azotobacter vinelandii* foi utilizada como substrato para atividade *in vitro* de DraT complexada ou não com as proteínas PII. Nas condições estabelecidas, GlnB foi necessária para a atividade de DraT na presença de Mg-ADP. O efetor de PII 2-oxoglutarato, na presença de Mg-ATP, inibiu a atividade do complexo DraT-GlnB, possivelmente induzindo a dissociação do complexo. A DraT também foi ativada por GlnZ, bem como ambas proteínas uridililadas. Entretanto, uma variante com deleção parcial na volta T não foi capaz de ativar DraT, sugerindo que este seja o sítio de interação entre DraT e GlnB. Estudos cinéticos revelaram que o complexo DraT-GlnB de *A. brasilense* é, pelo menos, 18 vezes mais eficiente do que DraT purificada de *R. rubrum*, mas com um valor de K_m para NAD^+ similar. Finalmente, os resultados mostraram que a ADP-ribosilação da proteína Fe não afeta o estado eletrônico do seu centro metálico, mas impede a associação da proteína Fe com a MoFe, conseqüentemente inibindo a transferência de elétrons.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, proteínas PII, ADP-ribosilação da proteína Fe, sistema DraT/DraG.

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation is catalyzed by a nitrogenase enzymatic complex. This complex contains two metalloproteins: the Fe and MoFe proteins and undergoes to post-translational modification. In *Azospirillum brasilense*, object of this study, this post-translational regulation involves the covalente modification in one of the subunits of Fe protein by ADP-ribosylation. This ADP-ribosylation reversibly inactivates the Fe protein and is catalyzed by DraT in response to an increase of ammonium concentration or decrease of cellular energy. The ADP-ribosyl is removed by DraG, promoting Fe protein and consequently nitrogenase re-activation. In addition to DraT and DraG proteins, the PII proteins are directly involved in this process of nitrogenase switch off. In this work the results for controlling of DraT by PII proteins are presented. An alternative protocol for natives PII proteins purification was developed using a thermal treatment (80°C/15 min) prior to the column injection. This thermal treatment improved the *A. brasilense* GlnB homogeneity from 70 to 99%. The high thermal stability was a common characteristic of several Proteobacterial PII proteins. The T_m values using Sypro Orange were greater than 77°C. ^1H NMR experiments showed that *A. brasilense* GlnB was stable up to 70°C. Furthermore, ^1H - ^{15}N TROSY experiments confirmed that GlnB samples obtained using or not the thermal treatment step retained the same overall folding. From these results, the protocol for purification of Proteobacterial PII proteins was developed using a thermal treatment 70°C/15 min step prior to the column injection, which led to increase from 70 to 95% in preparations homogeneity and higher GlnB amount after chromatography. To assess the involment of *A. brasilense* GlnB and GlnZ in the regulation of DraT, *Azotobacter vinelandii* Fe protein was used as substrate for *in vitro* DraT activity complexed or not with PII proteins. Under the established conditions, GlnB was necessary for DraT activity in the presence of Mg-ADP. The PII effector 2-oxoglutarate, in the presence of Mg-ATP, inhibited DraT-GlnB activity, possibly by inducing complex dissociation. DraT was also activated by GlnZ and by both uridylylated PII proteins. However, a GlnB variant carrying a partial deletion of the T-loop was not able to activate DraT, suggesting this region as a docking site for DraT-GlnB interaction. Kinetics studies revealed that the *A. brasilense* DraT-GlnB complex was at least 18-fold more efficient than DraT purified from *R. rubrum*, but with a similar K_m value for NAD^+ . Finally, the results showed that the ADP-ribosylation of Fe protein does not affect the electronic state of its metal cluster but prevents the association between Fe and MoFe proteins, consequently inhibiting the electron transfer.

Key-words: *Azospirillum brasilense*, PII proteins, Fe protein ADP-ribosylation, DraT/DraG system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELO ESTRUTURAL DO COMPLEXO NITROGENASE DE <i>AZOTOBACTER VINELANDII</i>	20
FIGURA 2 - MECANISMO DE REAÇÃO DA NITROGENASE	21
FIGURA 3 - NÍVEIS DE REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PROTEOBACTÉRIAS	23
FIGURA 4 - MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA AMTB DE <i>E. COLI</i> E O MODELO DE TRANSPORTE DE AMÔNIA SUGERIDO PARA ESTA PROTEÍNA	25
FIGURA 5 - MODELO REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS PII.....	27
FIGURA 6 - MODELO DA REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE <i>NIFA</i> EM RESPOSTA AO NÍVEL DE NITROGÊNIO FIXADO PELA PII	29
FIGURA 7. REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE POR ADP- RIBOSILAÇÃO REVERSÍVEL	37
FIGURA 8. MODELO PARA O ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS PII, AMTB, DRAT, DRAG E EFETORES NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	40
FIGURA 9. PRINCÍPIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	43
FIGURA 10 - PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GLNB DE <i>A. BRASILENSE</i>	68
FIGURA 11 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA GLNB DE <i>A. BRASILENSE</i> EXPRESSA EM <i>E. COLI</i>	69
FIGURA 12 - DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO UTILIZANDO SYPRO ORANGE	71
FIGURA 13 - FORMAÇÃO DE HETEROTRÍMEROS ENTRE GLNZ E GLNZ-UMP ₃ EM DIFERENTES TEMPERATURAS	72
FIGURA 14 - CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GLNB NATIVA DE <i>A.</i> <i>BRASILENSE</i> EM MEIO MÍMIMO NÃO MARCADO	73
FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) EXPRESSANDO A PROTEÍNA GLNB NATIVA (¹⁵ N, ² H) DE <i>A.</i> <i>BRASILENSE</i>	75
FIGURA 16 - ESPECTROS ¹ H DA GLNB DE <i>A. BRASILENSE</i> MARCADA (¹⁵ N, ² H) OBTIDOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS	76
FIGURA 17 - ESPECTRO ¹ H- ¹⁵ N TROSY DA PROTEÍNA GLNB NATIVA DE <i>A.</i> <i>BRASILENSE</i> MARCADA (¹⁵ N, ² H)	77
FIGURA 18 - ESPECTRO ¹ H- ¹⁵ N TROSY DA PROTEÍNA GLNB MARCADA (¹⁵ N, ² H) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE 2-OXOGLUTARATO	79
FIGURA 19 - ESPECTRO ¹ H- ¹⁵ N TROSY DA PROTEÍNA GLNB MARCADA (¹⁵ N, ² H) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ATP.....	80
FIGURA 20 - ADP-RIBOSILAÇÃO DA PROTEÍNA FE DEPENDENTE DE AMÔNIO EM ESTIRPES DE <i>A. BRASILENSE</i>	81
FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS MOFE E FE DE <i>A.</i> <i>VINELANDII</i>	83
FIGURA 22 - PERFIL REPRESENTATIVO DA PURIFICAÇÃO DE DRAT DE <i>A.</i> <i>BRASILENSE</i>	85
FIGURA 23 - PERFIL REPRESENTATIVO DA CO-PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO HISDRAT-GLNB DE <i>A. BRASILENSE</i>	86
FIGURA 24 - ATIVIDADE E MODIFICAÇÃO DA PROTEÍNA FE APÓS ATIVIDADE DO COMPLEXO DRAT-GLNB.....	87
FIGURA 25 - URIDILILAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS PROTEÍNAS GLNB E GLNZ UTILIZANDO GLND DE <i>A. BRASILENSE</i>	88
FIGURA 26 - REGULAÇÃO DE DRAT POR PROTEÍNAS PII	89

FIGURA 27 - EFEITO DE ADP, ATP E 2-OXOGLUTARATO NA ATIVIDADE DO COMPLEXO DRAT-GLNB.....	91
FIGURA 28 - EFEITO DE ATP E 2-OXOGLUTARATO NA ATIVIDADE DO COMPLEXO DRAT-GLNB.....	92
FIGURA 29 - DETERMINAÇÃO DO K_M PARA NAD^+ NA REAÇÃO DE ADP-RIBOSILAÇÃO DA PROTEÍNA FE DE <i>AZOTOBACTER VINELANDII</i> CATALISADA PELO COMPLEXO DRAT-GLNB.....	93
FIGURA 30 - ESPECTROS DE EPR DAS PROTEÍNAS FE NÃO-MODIFICADA E ADP-RIBOSILADA DE <i>A. VINELANDII</i>	95
FIGURA 31 - TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRON DA PROTEÍNA FE PARA A MoFe MONITORADA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUXO INTERROMPIDO.....	96
FIGURA 32. PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DRAG DE <i>A. BRASILENSE</i>	98
FIGURA 33 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA AMTB DE <i>A. BRASILENSE</i> PURIFICADA.....	98
FIGURA 34 - REATIVAÇÃO DA PROTEÍNA FE UTILIZANDO DRAG DE <i>A. BRASILENSE</i>	99
FIGURA 35 - MODELO PARA A REGULAÇÃO DO SISTEMA DRAT/DRAG NO CONTROLE DA ATIVIDADE DA NITROGENASE POR PROTEÍNAS PII EM <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS PII NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EFETORES.	31
TABELA 2 - BACTÉRIAS E ANTIBIÓTICOS	47
TABELA 3 - PLASMÍDEOS	48
TABELA 4 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GLNB DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	70
TABELA 5 - VALORES DE TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO DE PROTEÍNAS PII DETERMINADOS UTILIZANDO SYPRO ORANGE	71
TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS PARA AS REAÇÕES CATALISADAS POR DRAT DE <i>R. RUBRUM</i> OU COMPLEXO DRAT-GLNB DE <i>A. BRASILENSE</i> UTILIZANDO COMO ACCEPTOR DE GRUPO ADP-RIBOSIL A PROTEÍNA FE DE <i>A. VINELANDII</i>	94

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADP	-	5' difosfato de adenosina
AmtB	-	transportador de amônia transmembrana
ATP	-	5' trifosfato de adenosina
BSA	-	Albumina de soro bovino
D.O.	-	densidade óptica
DraG	-	dinitrogenase redutase glicohidrolase
DraT	-	dinitrogenase ADP-ribosil transferase
DTT	-	ditiotreitól
EDTA	-	ácido etilenodiamino-tetra ético
EMBRAPA	-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Fe-ADPR	-	proteína Fe ADP-ribosilada
FS	-	Fração solúvel
GDH	-	glutamato desidrogenase
GlnB(UMP)	-	proteína GlnB uridililada
GlnD	-	enzima que catalisa a uridililação e desuridililação de proteínas PII
GlnZ(UMP)	-	proteína GlnZ uridililada
GOGAT	-	glutamato sintase
GS	-	glutamina sintetase
HSQC	-	<i>Heteronuclear Single-Quantum Coherence</i> , espectroscopia de correlação, para correlacionar o N do grupo amida com o próton ligado a ele
IMAC	-	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
IPTG	-	β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
m/v	-	massa por volume
NAD ⁺	-	nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	-	nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NifH	-	proteína Fe ou dinitrogenase redutase
PDB	-	<i>Protein Data Bank</i>
R	-	Resistência a antibiótico
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
TROSY	-	<i>Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy</i>
UMP	-	5' monofosfato de uracila
2-OG	-	2-oxoglutarato ou α -cetoglutarato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	17
2.2 NITROGENASE	18
2.3 BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO	22
2.3.1 <i>Azospirillum brasilense</i>	22
2.4 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE N ₂	23
2.5 CAPTAÇÃO DE AMÔNIO.....	24
2.6 ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO	25
2.7 PROTEÍNAS DA SUPERFAMÍLIA PII – ESTRUTURA, FUNÇÃO E REGULAÇÃO	26
2.7.1 Proteínas PII em <i>Azospirillum brasilense</i> – GlnB e GlnZ.....	35
2.8 REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA NITROGENASE	35
2.8.1 Controle do desligamento/religamento da nitrogenase por ADP-ribosilação em <i>A. brasilense</i>	39
2.8.2 Outros mecanismos de desligamento da nitrogenase.....	40
2.9 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	41
2.9.1 Análise conformacional de proteínas por RMN	43
3 JUSTIFICATIVA	45
4 OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GERAL.....	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.1 BACTÉRIAS E ANTIOTIÓTICOS.....	47
5.2 PLASMÍDEOS	48
5.3 MEIOS DE CULTURA.....	48
5.3.1 Meios para o cultivo de <i>A. brasilense</i>	48
5.3.2 Meios para o cultivo de <i>A. vinelandii</i>	49
5.3.3 Meios para cultivo de <i>E. coli</i>	50
5.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	51
5.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	52
5.5.1 Transformação de células quimicamente competentes.....	52
5.6 SUPER-EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS GLNZ, GLNB, DRAG, DRAT E AMTB DE <i>A. BRASILENSE</i>	52
5.6.1 Super-expressão das proteínas PII, GlnB e GlnZ.....	52
5.6.1.1 Super-expressão de GlnB duplamente marcada com ¹⁵ N e ² H	53
5.6.2 Super-expressão de DraT e do complexo DraT-GlnB	53
5.6.3 Super-expressão de DraG	54
5.6.4 Super-expressão de AmtB	54
5.6.5 Super-expressão de GlnD.....	55
5.7 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FE E MOFE DE <i>A. VINELANDII</i>	55
5.8 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	56
5.8.1 Proteínas PII.....	56
5.8.2 Purificação da proteína DraT	56
5.8.3 Purificação do complexo DraT-GlnB	57
5.8.4 Purificação da proteína DraG.....	57
5.8.5 Purificação da proteína AmtB.....	57
5.8.6 Purificação da proteína GlnD	58

5.8.7 Purificação das proteínas Fe e MoFe.....	58
5.9 ANÁLISE DE PROTEÍNAS	60
5.9.1 Eletroforese de proteínas.....	60
5.9.2 Eletroforese de proteínas sob condições nativas	60
5.9.3 Determinação de proteínas.....	60
5.9.4 <i>Western Blot</i>	61
5.10 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE <i>MELTING</i>	61
5.11 ENSAIOS DE URIDILILAÇÃO	61
5.12 FORMAÇÃO DE HETEROTRÍMEROS	61
5.13 ATIVIDADE DA DRAT	62
5.14 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	63
5.14.1 Ligação dos efetores a proteína GlnB	63
5.15 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA	63
5.16 ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUXO INTERROMPIDO (STOPPED-FLOW)	64
5.17 ENSAIO DE ATIVIDADE DE DRAG.....	64
5.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
6.1 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PII.....	66
6.2 ESTABILIDADE TÉRMICA DE PROTEÍNAS PII	70
6.3 ESTUDO CONFORMACIONAL DA PROTEÍNA GLNB NATIVA DE A. BRASILENSE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	73
6.3.1 Efeito do tratamento térmico na GlnB no processo de purificação	74
6.3.2 Efeito da temperatura na conformação global de GlnB de <i>Azospirillum brasiliense</i>	75
6.3.3 Efeito do tratamento térmico para purificação de proteínas PII na conformação da GlnB	76
6.4 INTERAÇÃO DOS EFETORES 2-OXOGLUTARATO E ATP COM GLNB.....	77
6.5 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA DRAT/DRAG IN VIVO EM A. BRASILENSE.....	81
6.6 ATIVAÇÃO DA DRAT PELA PROTEÍNA GLNB DE A. BRASILENSE	82
6.6.1 Especificidade da ativação da DraT pelas proteínas PII	88
6.6.2 Efeito dos efetores de PII na ativação de DraT por GlnB	89
6.6.3 Mecanismo de ativação de DraT por GlnB.....	92
6.7 MECANISMO DE INATIVAÇÃO DA PROTEÍNA FE POR ADP-RIBOSILAÇÃO..	94
6.8 REATIVAÇÃO DA PROTEÍNA FE ADP-RIBOSILADA.....	97
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
8 CONCLUSÕES	102
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio é de fundamental importância para o ambiente e para a agricultura mundial. Frequentemente, a disponibilidade de nitrogênio fixado é um dos fatores limitantes para produtividade de culturas com interesse econômico (DIXON e KAHN, 2004). A reação é catalisada por um complexo enzimático denominado nitrogenase. A nitrogenase contém 2 componentes que são nomeados de acordo com sua composição metálica. O componente dimérico menor (γ_2) é a dinitrogenase redutase, também conhecido como a proteína Fe ou NifH. A proteína Fe funciona como um doador de elétrons dependente de ATP, cuja função é transportar elétrons até a proteína MoFe, o segundo componente da nitrogenase. Esta subunidade também é conhecida como dinitrogenase ou NifDK ($\alpha_2\beta_2$) e contém o sítio ativo da enzima. Para cada elétron transportado existe o gasto de 2 moléculas de ATP. Para a redução de cada N_2 a $2NH_3$ são gastas 16 moléculas de ATP. Dada alta demanda energética celular, este é um processo finamente regulado. Além da regulação a nível transcricional, a atividade da nitrogenase também é regulada de forma pós-traducional em alguns diazotrofos. Por exemplo, em *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* e *Azospirillum brasilense* esta regulação ocorre por ADP-ribosilação no resíduo de arginina 101 em um dos monômeros da proteína Fe pela dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT), resultando na inativação da proteína Fe (ZHANG *et al.*, 1997). A ADP-ribosilação da proteína Fe é revertida pela glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase (DraG), em condições limitantes de nitrogênio, mantendo a nitrogenase ativa (*switch-on*) (NORDLUND e TRIPLETT, 2000; HALBLEIB e LUDDEN, 1999; Zhang *et al.*, 1997).

Fortes indícios têm implicado que proteínas transdutoras de sinal de nitrogênio celular da família P_{II} e membros da família de proteínas de membrana responsáveis pela captação de amônio (Amt) estão diretamente envolvidos na regulação do sistema DraT/DraG em diferentes organismos (HUERGO *et al.*, 2009; HUERGO *et al.*, 2007; TREMBLAY *et al.*, 2007; HUERGO *et al.*, 2006a; HUERGO *et al.*, 2006b; WANG *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2001).

As proteínas PII controlam o metabolismo de nitrogênio por interação direta com enzimas, fatores de transcrição e com proteínas de membranas (FORCHHAMMER, 2008; NINFA e ATKINSON, 2000). As proteínas PII apresentam dois tipos de regulação, covalente e alostérica, em resposta a mudanças fisiológicas. A modificação covalente foi inicialmente reconhecida como a uridililação do resíduo de

tirosina 51 (Tyr51) na volta T da GlnB de *E. coli*. (revisado por FORCHHAMMER, 2008; ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). A regulação alostérica ocorre em resposta à ligação de efetores (ATP, ADP e 2-oxoglutarato). A interação entre os efetores e as proteínas PII já foi mostrada por cristalografia (TRUAN *et al.*, 2010; CONROY *et al.*, 2007).

Recentemente foi obtido um modelo baseado em ensaios de interação proteína-proteína que explicaria o papel das proteínas PII (GlnB e GlnZ) e AmtB na regulação das enzimas DraT e DraG de *A. brasilense in vitro* em resposta a flutuações nos níveis de amônio extracelular (HUERGO *et al.*, 2009). O fato de complexo DraT-GlnB ser estável somente em condições onde DraT está ativa, levou a hipótese de que esta interação seria responsável pela ativação de DraT (HUERGO *et al.*, 2009).

Este trabalho tem como principal objetivo a caracterização funcional do controle da atividade de DraT e DraG pelas proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense*.

Um melhor entendimento da ADP-ribosilação que regula pós-traducionalmente a nitrogenase, não somente melhorará a compreensão dos aspectos funcionais deste processo, como também será possível propor um modelo de regulação da atividade do sistema DraT/DraG em resposta a íons amônio que pode ser extrapolado para outros diazotrofos que possuem este sistema de regulação da nitrogenase.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é elemento fundamental para a síntese de importantes biomoléculas, como proteínas e ácidos nucléicos. As bactérias desenvolveram mecanismos de utilização de diversas fontes de nitrogênio como amônio, glutamina, glutamato, aminoácidos, NO_3^- e NO_2^- , além do dinitrogênio atmosférico (N_2). Alguns destes compostos podem ser diretamente assimilados, como é o caso da glutamina e glutamato. Os outros, como o NO_3^- , NO_2^- e N_2 devem ser primeiramente reduzidos para, então, serem assimilados (REITZER, 2003).

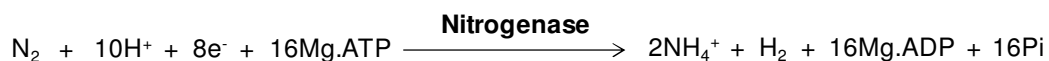
O N_2 é a forma mais abundante de nitrogênio na terra, correspondendo a 78% da atmosfera e tem que ser reduzido a NH_3 antes de ser assimilado. A reação de redução de N_2 é denominada fixação biológica de nitrogênio. A fixação de nitrogênio é amplamente distribuída entre os domínios Bacteria e Archaea. Os organismos fixadores de N_2 são chamados diazotros e nenhum eucarioto tem esta capacidade (FORCHHAMMER, 2008; MASEPOHL e FORCHHAMMER, 2007; DIXON e KAHN, 2004).

A fixação biológica de N_2 é de grande importância econômica, pois o nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento vegetal. A produção mundial de fertilizantes nitrogenados foi de aproximadamente 127 milhões de toneladas em 2007, cujo maior produtor é a Ásia oriental (37,2%). China, Índia e Estados Unidos utilizaram mais de 92 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados em 2006 (ADESEMOYE e KLOEPFER, 2009). No Brasil, o gasto médio com fertilizantes nitrogenados para a produção do arroz e de cana-de-açúcar é de 882 milhões e de 265 milhões de reais, respectivamente (EMBRAPA, 2005; EMBRAPA, 2008). Metade dos fertilizantes nitrogenados aplicados é perdida devido ação de chuvas, erosão e atividade bacteriana (PIERZYNSKI *et al.*, 1994). Além dos aspectos econômicos, a utilização de fertilizantes nitrogenados causa problemas ambientais como eutrofização de rios e lagos, acidificação do solo e emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera, além de grande quantidade de energia fóssil para a produção destes fertilizantes (DIXON e KAHN, 2004). Assim, práticas que utilizem o processo natural de fixação de nitrogênio e, conseqüentemente, menor aplicação de fertilizantes nitrogenados, devem ser expandidas. Portanto, o melhor entendimento do processo de fixação biológica de nitrogênio e sua regulação são fundamentais para o desenvolvimento de agricultura sustentável.

A fixação biológica de nitrogênio é conhecida desde 1888 quando Hellriegel e Wilfarth demonstraram que legumes poderiam utilizar nitrogênio atmosférico para crescimento e que este processo dependia da presença de bactéria nos nódulos das raízes. Somente em 1966 e 1967, a enzima que catalisa este processo, a nitrogenase, foi descrita em *Azotobacter vinelandii* e *Clostridium pasteurianum* (MORTENSON *et al.* 1967; BULEN e LECOMTE, 1966). Desde então, a importância deste processo tem impulsionado trabalhos envolvendo caracterização e regulação da nitrogenase (HU e RIBBE, 2011).

2.2 NITROGENASE

A redução de N_2 a $2NH_3$ é catalisada por uma enzima chamada nitrogenase, como mostra a seguinte reação (SIMPSON e BURRIS, 1984):



Nitrogenases são metaloenzimas sensíveis a oxigênio com estrutura e mecanismos de catálise conservados. Estas enzimas contêm 2 componentes (Figura 1). O componente dimérico menor (γ_2) e denominado dinitrogenase redutase, proteína Fe (porque contém um centro $[4Fe-4S]$) ou NifH. O segundo componente é o heterotetramêro ($\alpha_2\beta_2$) denominado dinitrogenase ou proteína MoFe ou NifDK e contém um centro $[8Fe-7S]$ chamado de centro P e um co-fator FeMo, que além de Mo, Fe e S, contém uma molécula de homocitrato ligado e um átomo central que provavelmente é carbono (LANCASTER *et al.*, 2011; SPATZAL *et al.*, 2011). O co-fator FeMo é o sítio catalítico da enzima (DIXON e KAHN, 2004). A proteína Fe funciona como um doador de elétrons dependente de ATP, cuja função é doar elétrons para a proteína MoFe. Para cada elétron transportado ocorre hidrólise de 2 moléculas de ATP (SEEFELDT *et al.*, 2009). Após a ligação de duas moléculas de MgATP na proteína Fe, esta proteína sofre uma mudança conformacional que altera o potencial de oxi-redução do núcleo $[4Fe4S]$, deixando-o reduzido, e promove sua associação com a proteína MoFe. Esta associação permite a transferência de um elétron. Danyal e colaboradores (2011) mostraram que a transferência de elétrons ocorre primeiro na proteína MoFe, do centro P para o co-fator MoFe nos seus estados de repouso ($P^N \rightarrow M^N$), em uma etapa lenta. Na segunda etapa, rápida, a proteína Fe com seu centro metálico reduzido pelo ditionito $[4Fe-4S]^{1+}$ repõe o elétron para o centro P ($Fe^{+1} \rightarrow P^{+1}$) tornando-se oxidado $[4Fe-4S]^{2+}$. Por isso esse mecanismo é denominado

deficit spending (Figura 2A). Após a transferência de elétron, a proteína Fe oxidada e ligada a MgADP dissocia-se da proteína MoFe, para ser novamente ligada a MgATP e reduzida. Este ciclo se repete até que o número de elétrons no co-fator FeMo seja suficiente para reduzir o substrato, em um complicado e ainda não totalmente entendido mecanismo de reação (Figura 2B) (LUKOYANOV *et al.*, 2012).

Dado seu rigoroso mecanismo de reação, a nitrogenase é capaz de reduzir diversos outros substratos mais fáceis do que N_2 (BOTHE *et al.*, 2006). O substrato mais utilizado para avaliar a atividade da nitrogenase *in vivo* e *in vitro* é o acetileno (C_2H_2) que é reduzido a etileno (C_2H_4). Quando nenhum outro substrato está presente, a nitrogenase é capaz de reduzir os prótons presentes na solução a H_2 (BARNEY *et al.*, 2004). Embora o monóxido de carbono (CO) seja considerado um inibidor da nitrogenase (BURGESS e LOWE, 1996), recentemente Yang e colaboradores (2011) demonstraram que a proteína MoFe contendo substituição do resíduo Val70 por Ala foi capaz de reduzir o CO a CH_4 . Além disso, o mutante V70A/H195Q catalisa a redução do CO_2 a CH_4 e ainda é capaz de acoplar a reação de redução de CO_2 e C_2H_2 para a formação de propileno (YANG *et al.*, 2012). Estes resultados demonstram a versatilidade da nitrogenase.

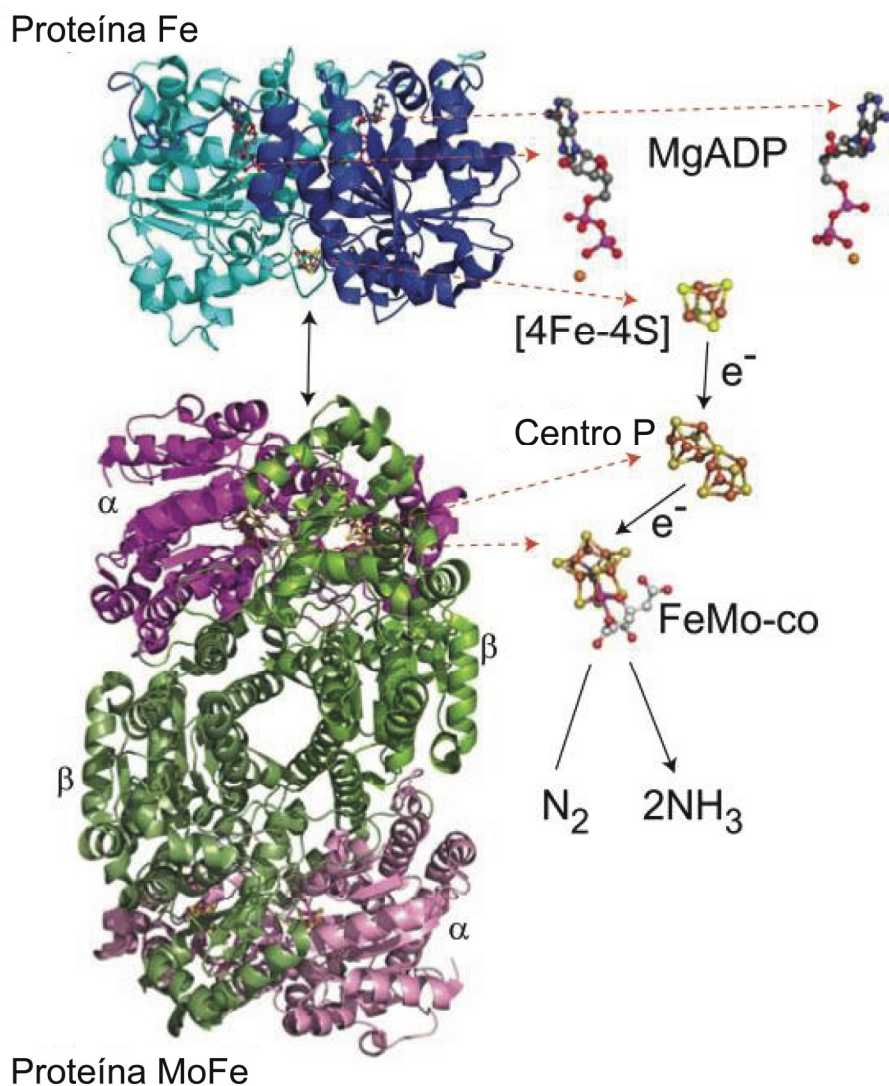


FIGURA 1 - MODELO ESTRUTURAL DO COMPLEXO NITROGENASE DE *Azotobacter vinelandii*

FONTE: Adaptado (SEEFELDT *et al.*, 2009).

NOTA: A proteína MoFe é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, com as subunidades α em rosa e as β em verde. A proteína Fe é um dímero γ_2 com cada subunidade mostrada com um tom de azul. A proteína MoFe liga-se a duas proteínas Fe e cada unidade $\alpha\beta$ funciona como uma unidade catalítica. Uma proteína Fe está apresentada associando-se a uma unidade $\alpha\beta$ da proteína MoFe. As posições relativas das duas moléculas de Mg-ADP, o centro metálico [4Fe-4S] da proteína Fe e os centros P [8Fe-7S] e cofator FeMo (FeMo-co) [7Fe-Mo-9S-homocitrato-C] da proteína MoFe estão mostrados.

2.3 BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

Os microrganismos capazes de realizar o processo de fixação de nitrogênio ou diazotrofos podem ser classificados em dois grupos de acordo com sua interação com parceiros vegetais. Grupo 1 - associativos que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e são capazes de fixar N_2 independente de um hospedeiro. Grupo 2 - diazotrofos simbióticos que dependem do estabelecimento de uma interação com o hospedeiro vegetal. Na simbiose, a planta fornece fonte de carbono e um ambiente protegido, enquanto a bactéria excreta íons amônio para a célula vegetal (BURRIS, 1991).

Dentre as bactérias do grupo 1 que fixam nitrogênio e promovem o crescimento vegetal, as dos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* são as mais estudadas (BALDANI e BALDANI, 2005).

2.3.1 *Azospirillum brasilense*

Azospirillum spp. são bactérias Gram negativas, curvas, de dimensão $0,8 \times 1,0 \times 25 \mu\text{m}$, microaerófilas, pertencentes à classe Alphaproteobacteria, associativas e com capacidade de fixar nitrogênio. A temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41°C, dependendo da espécie. As células são móveis com um único flagelo polar (FIBACH-PALDI *et al.*, 2012).

Atualmente 16 espécies pertencentes a este gênero foram descritas (FIBACH-PALDI *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que bactérias deste gênero exercem efeitos benéficos sobre o crescimento de mais de 100 espécies vegetais, desde gramíneas a dicotiledôneas, aumentando, assim, sua produtividade agrícola, embora o mecanismo exato pelo qual isso ocorra ainda não seja conhecido. Além disso, em muitos casos a inoculação destas bactérias reduziu a utilização de fertilizantes químicos, principalmente os nitrogenados, de 20 a 50% (BASHAN *et al.*, 2004).

A. brasilense é uma bactéria encontrada associada a várias espécies de importância agroeconômica. A fixação de nitrogênio em *A. brasilense* ocorre sob condições específicas de concentração de oxigênio, temperatura, fonte de carbono e de energia. A pressão parcial de O_2 ideal para que ocorra a fixação de nitrogênio está na faixa de 0,2 kPa de oxigênio dissolvido. O aumento de oxigênio para 2 kPa é capaz de promover rápida inibição da atividade da nitrogenase, sem nenhuma modificação covalente na nitrogenase, a qual é restaurada quando as condições de microaerofilia são restabelecidas (HARTMANN e BURRIS, 1987).

2.4 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE N₂

Em vista do alto custo energético envolvido na redução do N₂ a NH₃, o processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado tanto ao nível pós-traducional da nitrogenase quanto na expressão de seus genes (*nifHDK*). Em Proteobactéria, a regulação deste processo ocorre em até 3 níveis (MASEPOHL e FORCHHAMMER, 2007) (Figura 3). No primeiro nível, encontra-se a cascata regulatória que controla a expressão da proteína ativadora da expressão dos genes *nif* estruturais, a proteína NifA. Neste nível em geral atua o sistema de regulação de nitrogênio (sistema Ntr). Este sistema foi inicialmente descrito em bactérias entéricas como *E. coli* e *K. pneumoniae* (MERRICK e EDWARDS, 1995). Em baixos níveis de N fixado (ausência de NH₄⁺), a proteína regulatória NtrC encontra-se ativada, promovendo a expressão do gene *nifA* (DIXON e KAHN, 2004). O segundo nível de regulação afeta a atividade da NifA. Neste nível, a atividade transcricional da NifA é modulada pelos *status* de N e redox da proteína. O terceiro nível de regulação afeta a atividade enzimática da nitrogenase em resposta às condições ambientais, conhecido também como o efeito de desligamento/religamento pós-traducional da nitrogenase (HALBLEIB e LUDDEN, 2000), que será detalhado posteriormente, dada sua relevância para o trabalho.

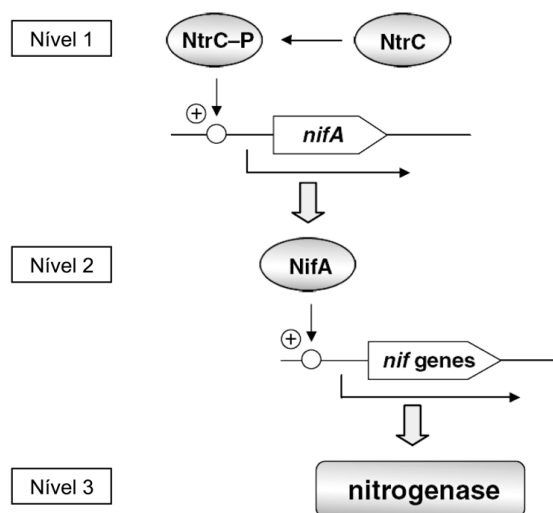


FIGURA 3 - NÍVEIS DE REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PROTEOBACTÉRIAS

FONTE: Adaptado (MASEPOHL e FORCHHAMMER, 2007).

Em *Azospirillum brasilense* existe um operon *nifHDK* que codifica para ambos componentes da nitrogenase e foi isolado com base na similaridade de sequência com

os genes *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae* (QUIVIGER *et al.*, 1982). Diferentemente do que para outros organismos, o gene *nifA* de *A. brasilense* é expresso na presença de oxigênio e nitrogênio fixado e independe de NtrC, pois mutantes *ntrC* de *A. brasilense* apresentam um fenótipo de fixação de nitrogênio positivo (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 1995; LIANG *et al.*, 1993).

2.5 CAPTAÇÃO DE AMÔNIO

Para que o amônio extracelular seja metabolizado ele precisa atravessar a membrana celular. A forma não protonada NH_3 (amônia) pode entrar na célula por difusão simples pela membrana lipídica, processo que pode ocorrer em ambas direções. Quando a concentração de amônio extracelular é alta, a difusão é suficiente para suportar o metabolismo celular. Esta difusão não é controlada e é muito lenta em pH baixo ou neutro. Em condições limitantes de amônio extracelular, faz-se necessária a presença de proteínas transportadoras (KLEINER, 1985).

Membros da família de proteínas de membrana responsáveis pela captação de amônio (Amt) são encontradas em Bacteria, Archaea, fungos e plantas. A obtenção de estruturas de cristal deste transportador de *E. coli* (AmtB) (ZHENG *et al.*, 2004) e de Amt1 de *Archaeoglobus fulgidus* (ANDRADE *et al.*, 2005) revelaram que estas proteínas são trímeros, com 11 hélices transmembranas que formam um canal hidrofóbico pelo qual as moléculas de amônia passam (KHADEMI *et al.*, 2004). O mecanismo proposto por Khademi e colaboradores (2004) sugere que NH_4^+ se ligaria a entrada do canal da proteína Amt, sendo então desprotonado a amônia pela entrada em um canal que reduz o pKa para <6. Após a passagem de NH_3 por este canal hidrofóbico, a amônia atinge o meio intracelular sendo novamente protonada (Figura 4).

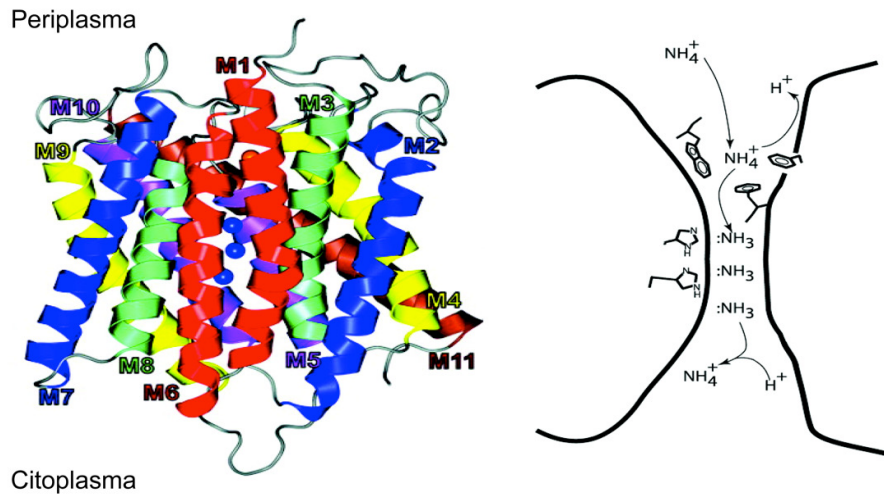
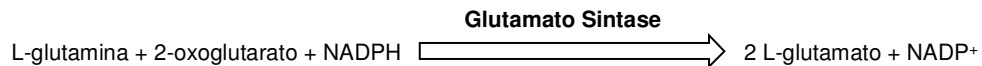
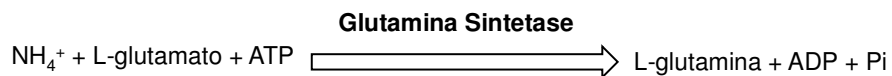


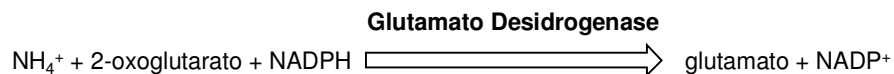
FIGURA 4 - MODELO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA AmtB de *E. coli* E O MODELO DE TRANSPORTE DE AMÔNIA SUGERIDO PARA ESTA PROTEÍNA
 FONTE: Adaptado (KHADEMI *et al.*, 2004).

2.6 ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO

O amônio obtido pelo processo de fixação de nitrogênio ou captado do meio externo é utilizado na síntese de glutamina e glutamato, os quais servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). A assimilação de amônio por microrganismos pode ocorrer por duas vias. A via 1 envolve a ação sequencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (MERRICK e EDWARD, 1995; ARCONDÉGUY *et al.*, 2001):



A via 2 envolve a enzima glutamato desidrogenase (GDH):



A via 1 de assimilação de amônio é a principal, ocorre em baixas concentrações de amônio e é a via predominante em *A. brasilense* (FIBACH-PALDI *et al.*, 2012). A via 2 ocorre quando a concentração intracelular de amônio é alta, pois a

GHD possui uma afinidade relativamente baixa por NH_4^+ (MERRICK e EDWARD, 1995). Recentemente foi demonstrado por experimentos de metaboloma que a via 1 é a mais utilizada para a assimilação de amônio em *E. coli* independente da concentração de amônio (YUAN *et al.*, 2009).

2.7 PROTEÍNAS DA SUPERFAMÍLIA PII – ESTRUTURA, FUNÇÃO E REGULAÇÃO

Proteínas de transdução de sinal da superfamília PII desempenham um papel importante na coordenação da regulação de processos metabólicos. Representantes desta família são encontrados em todos os domínios: Bacteria, Archaea fixadoras de nitrogênio e nos cloroplastos dos eucariotos fototróficos (algas vermelhas e plantas) (FORCHHAMMER, 2008).

Este sistema de sinalização tem sido extensivamente estudado e algumas revisões o descrevem em profundidade (HUERGO *et al.*, 2012b; FORCHHAMMER, 2008; REITZER, 2003; ARCONDÉGUY, *et al.*, 2001; NINFA e ATKINSON, 2000). De uma forma geral, sabe-se que sinais a partir do carbono, nitrogênio e estado energético causam alterações conformacionais pela ligação de efetores e modificação pós-traducional das proteínas PII. Dependendo destes estados de conformação e modificação, as PII interagem com diferentes proteínas-alvo, como ativadores transcricionais, enzimas e transportadores de membrana que em sua maioria realizam ou regulam as reações de assimilação de nitrogênio (FORCHHAMMER, 2008).

As proteínas PII, GlnB e GlnK, sendo a última denominada GlnZ somente em *A. brasilense*, são (homo)triméricas com massa molecular de 12 a 13 kDa por monômero (Figura 5). Estas proteínas possuem uma estrutura tridimensional altamente conservada. Cada monômero possui aproximadamente 112 aminoácidos dispostos em dois domínios β - α - β e três voltas proeminentes: B, C (por estar na porção C-terminal) e T (por conter o resíduo de Tyr51) (FORCHHAMMER, 2008).

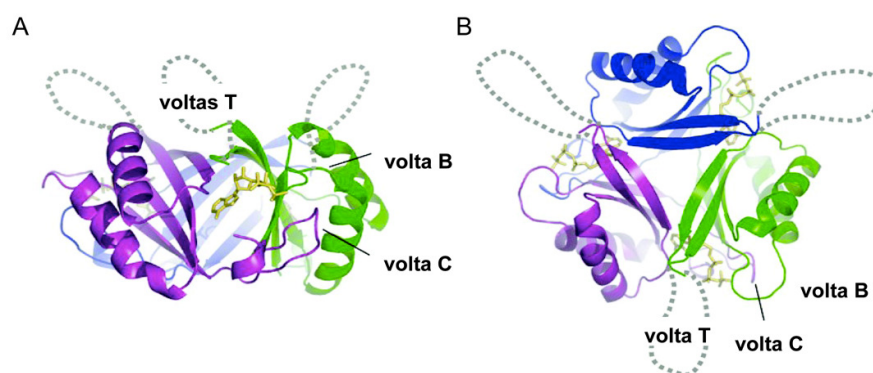


FIGURA 5 - MODELO REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS PII

FONTE: Adaptado (FORCHHAMMER, 2008).

NOTA: Representação da GlnK de *E. coli* co-cristalizada com ATP: vista lateral (A) e superior (B). Cada subunidade está representada por uma cor: lilás, verde e azul, e o ATP em amarelo. As voltas denominadas B, C e T estão em destaque.

De acordo com a nomenclatura atual das PII, elas podem ser classificadas em três subgrupos: os produtos dos genes *glnB*, *glnK* e *nifH*. Sendo *glnB* ligado a *glnA* (codifica GS) ou *nadE* (codifica NAD sintetase), *glnK* ligada a *amtB* e *nifH* associado a genes *nifH*, *nifD* e *nifK* (HUERGO *et al.*, 2012b). O último subgrupo é presente em Archaea e algumas bactérias estritamente anaeróbicas, enquanto GlnB e GlnK são comuns em diferentes organismos. Ao contrário da expressão constitutiva do gene *glnB*, *glnK* está sob controle do sistema Ntr. A expressão do operon *glnK-amtB* é ativada por NtrC em condições limitantes de oxigênio (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; REITZER, 2003). *R. rubrum* e *Azoarcus* sp. BH72 apresentam uma terceira proteína PII similar a GlnK denominada GlnJ ou GlnY, respectivamente (MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002; ZHANG *et al.*, 2001c).

Apesar da alta similaridade entre GlnB e GlnK, suas funções celulares são distintas e podem depender do microrganismo (DREPPER *et al.*, 2003; MARTIN e REINHOLD-HUREK, 2002; ZHANG *et al.*, 2001c; NINFA e ATINKSON, 2000; ARCONDÉGUY *et al.*, 1999). Em *E. coli*, GlnB controla a atividade da glutamina sintetase e a quinase NtrB (Fig. 6), enquanto em *R. rubrum* e *A. brasilense* GlnB possui em papel fundamental na atividade da NifA (ZHANG *et al.*, 2001c; ZHANG *et al.*, 2000; DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). Em *H. seropedicae*, GlnK tem papel fundamental no controle da atividade da NifA (CHUBATSU *et al.*, 2012; NOINDORF *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 1999). Em *K. pneumoniae*, somente GlnK está envolvida na transmissão do sinal de nitrogênio para o sistema NifL/NifA (ARCONDÉGUY *et al.*, 1999).

A sinalização por proteínas PII e a sua capacidade de interagir com proteínas-alvo tem sido relacionadas com a conformação da volta T (RADCHENKO e MERRICK, 2011). Em Proteobactérias, as voltas T de PII estão sujeitas a uridililação reversível em um resíduo conservado de Tyr (51) (Figura 6). O mecanismo de uridililação das proteínas GlnB foi melhor estudado em *E. coli*, onde as proteínas GlnB e GlnD purificadas foram utilizadas para avaliar os parâmetros cinéticos da reação *in vitro* (ATHINKSON *et al.*, 1994). Os autores propuseram que a reação de uridililação da proteína GlnB é não-cooperativa, uma vez que as formas mono e di-uridililadas foram encontradas quando as reações foram analisadas ao longo do tempo, e ao final da reação, a PII estava completamente uridililada. A uridililação ocorre por um mecanismo sequencial ordenado, onde a enzima GlnD liga primeiro a proteína GlnB e em seguida o segundo substrato, UTP. Após a reação são liberados os produtos PPI e GlnB-UMP, nesta ordem. A atividade de transferência ou remoção de grupo uridilil é regulada, por sua vez, pelos níveis de nitrogênio/glutamina celulares. Em condições limitantes de nitrogênio a concentração de glutamina celular é baixa e a atividade de uridililtransferase é estimulada. Nesta condição, GlnD catalisa a adição de um grupamento uridilil ao resíduo de Tyr51 da PII, sinalizando o início da cascata do sistema Ntr para a fixação de nitrogênio (JIANG *et al.*, 1998). As PII uridililadas não conseguem se ligar à proteína NtrB, que na forma livre catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a (Figura 6). Além disso, nesta condição, elas estimulam a adeniltransferase (ATase, GlnE) que desadenila a enzima GS, ativando-a. Em ambas atividades GlnB parece ser mais eficiente que GlnK. Em altos níveis de nitrogênio fixado, a concentração intracelular de glutamina é alta, sinalizando para a atividade uridilil removidora. As PII desuridililadas ligam-se a proteína NtrB e GlnE que inativam a NtrC e GS, respectivamente (MASEPOHL e FORCHHAMMER, 2007; ARCONDÉGUY *et al.*, 2001; NINFA e ATKINSON, 2000; MERRICK e EDWARDS, 1995).

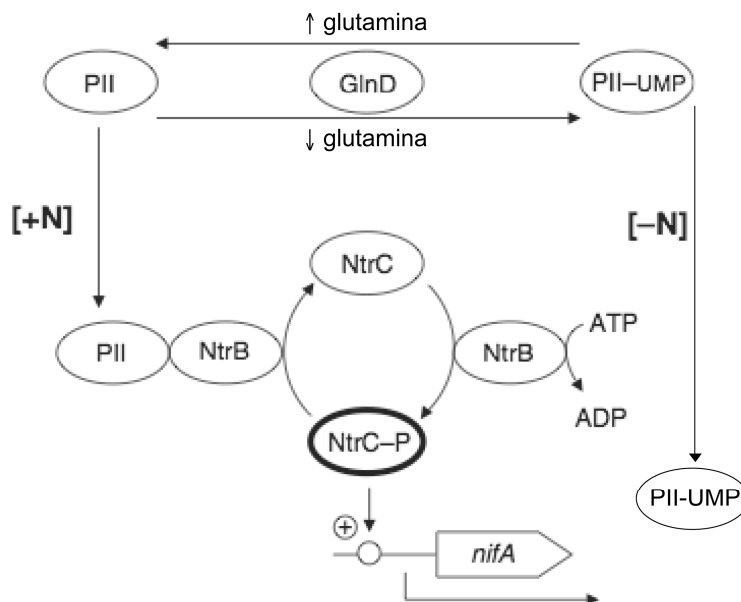


FIGURA 6 - MODELO DA REGULAÇÃO TRANSCRIPCIONAL DE *nifA* EM RESPOSTA AO NÍVEL DE NITROGÊNIO FIXADO PELA PII

FONTE: Adaptado (MASEPOHL e FORCHHAMMER, 2007).

NOTA: Em baixos níveis de N fixado ou de glutamina, ocorre a uridililação da PII, o que impede a interação com NtrB que, por sua vez, fosforila NtrC, a qual ativa a transcrição de *nifA*. Esta regulação ocorre na maioria das proteobactérias, como *E. coli*, e é ausente em *A. vinelandii*, *A. brasilense* e *R. rubrum*.

Embora a estrutura das PII seja muito similar em diferentes classes de organismos, em PII de cianobactérias este mecanismo de regulação por uridililação não ocorre. Apesar do resíduo de Tyr-51 estar presente na GlnB da cianobactéria *Synechococcus* sp. estirpe PCC6803, ele não é uridililado provavelmente pela ausência de um homólogo *glnD* (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). A modificação covalente nestes organismos ocorre por fosforilação de um resíduo de Ser49 que também está presente na volta T. Assim como ocorre em Proteobacteria, as PII de cianobactérias são modificadas em condições de baixo nitrogênio. A desfosforilação é catalisada por uma proteína fosfatase MM (dependente de Mg^{2+} e Mn^{2+}) (FORCHHAMMER, 2008; FORCHHAMMER, 2004).

Além da regulação pós-traducional de PII, estas proteínas também são reguladas alostericamente pela ligação de efetores como ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG). Cada monômero de PII possui um sítio de ligação a nucleotídeo e um sítio de ligação a 2-OG (TRUAN *et al.*, 2010; CONROY *et al.*, 2007). O ATP e ADP ligam competitivamente no mesmo sítio (TRUAN *et al.*, 2010). Estudos recentes sugerem que proteínas PII respondem a razão ATP/ADP *in vitro* (FOKINA *et al.*, 2011; JIANG e

NINFA, 2009). O 2-OG é o responsável por direcionar a ocupação por ATP ou ADP. Alta concentração celular de 2-OG favorece a ocupação de ATP e esta condição é pré-requisito para a uridililação de GlnZ e GlnK (BONATTO *et al.*, 2012; GERHARDT *et al.*, 2012).

Portanto, tanto o status de uridililação quanto a ligação de efetores em P_{II} alteram a conformação da volta T e conseqüentemente a interação das P_{II} com suas proteínas-alvo. Em inúmeras estruturas de PII complexadas a proteínas-alvo, a volta T tem se mostrado fundamental nestas interações (HUERGO *et al.*, 2012b). A única exceção é o complexo DraG-GlnZ, onde a maior parte dos resíduos de aminoácidos da volta T não participam da interação com DraG, expandindo ainda mais a variabilidade de interações proteína-proteína que as PII realizam (RAJENDRAN *et al.*, 2011).

Para as aproximadamente 50 estruturas de PII obtidas, sendo 7 complexadas com outras proteínas (Tabela 1), foi utilizada a difração de raios-X dos cristais obtidos. Todavia, considerando que muitas proteínas não cristalizam de forma adequada para as análises cristalográficas e que para esta análise as proteínas são submetidas a uma condição que favorece a compactação, pela própria formação da estrutura cristalina, existe a necessidade de se estudar a dinâmica conformacional desta família de proteínas em solução, de forma complementar à cristalização ou para avaliar aspectos funcionais conjuntamente (MONTELIONE *et al.*, 2000). Para isso, são utilizados os métodos de ressonância magnética nuclear (RMN), que serão abordados posteriormente.

TABELA 1 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS PII NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EFETORES.

Proteína P _{II}	Microorganismo	Determinação estrutural/ resolução (Å)	Presença de efetores	Considerações	PDB	Referência
GlnB	<i>E. coli</i>	Difração de raios-X/ 2,7	-	Presença de motivos $\beta\alpha\beta$. Cada monômero é formado por 8 folhas β estendidas e antiparalelas cercadas por seis α -hélices	1PIL	CHEAH <i>et al.</i> , 1994
GlnB	<i>E. coli</i>	Difração de raios-X/ 1,9	-	Refinamento da estrutura obtida por Cheah et al, 1994	2PII	CARR <i>et al.</i> , 1996
GlnK	<i>E. coli</i>	Difração de raios-X - cristalização e co- cristalização/ 2,0	ATP	Flexibilidade da volta T em solução; o ATP liga-se a uma fenda entre os monômeros, influenciando na flexibilidade da volta T	1GNK, 2GNK	XU <i>et al.</i> , 1998
GlnB	<i>E. coli</i>	Difração de raio-X - cristalização e co-cristalização	ATP	Descrição da estrutura da PII na presença de ATP com as análises de dois cristais (II e III), obtidos com diferentes condições de cristalização. O tampão de cristalização continha condições saturantes de ATP e 2-OG. Obtenção de modelos para heterotrímeros GlnB/GlnK.		XU <i>et al.</i> , 2001
GlnK	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Difração de raios-X / 1,7-2,7	-	Estrutura similar às obtidas para diferentes GlnB e GlnK de <i>E. coli</i> . Obtenção de 15 diferentes conformações da volta T: flexibilidade.	1V90, 1V3S, 1UFL	SAKAI <i>et al.</i> , 2005
GlnB	<i>Neisseria meningitidis</i>	Difração de raios-X /1,85	-	Flexibilidade da volta T (resíduos 37-55) pode ser considerada semi-desordenada dos resíduos 38 ao 52. O enovelamento é conservado com outras proteínas PII, especialmente nos resíduos de ligação ao ATP.	2GW8	NICHOLS <i>et al.</i> , 2006
GlnB	<i>H. seropedicae</i>	Difração de raios-X/ 2,1		Trímero de 36 kDa. Os monômeros estão acomodados em torno de um eixo central e o monômero central tem 2 motivos $\beta\alpha\beta$. As folhas β , as α -hélices e a volta B curta são bem conservadas com outras PII. As maiores diferenças estão na volta T e na volta C.	1HWU	MACHADO BENELLI <i>et al.</i> , 2002

* ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; 2-OG, 2-oxoglutarato ou α -cetoglutarato; NAG, *N*-acetilglutamato; NAGK, *N*-acetilglutamato quinase, AmtB, transportador de amônia transmembrana; DraG, glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase.

TABELA 1 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS PII NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EFETORES (CONTINUAÇÃO).

Proteína P _{II}	Microrganismo	Determinação estrutural/ resolução (Å)	Presença de efetores	Considerações	PDB	Referência
GlnK1	<i>Methanococcus jannaschii</i>	Difração de raio-X - cristalização e co-cristalização/ 2,1 (sem ATP), 1,2 (ATP) e 1,6 (ATP e 2-OG)	ATP e 2-OG	A volta T assumiu uma conformação compacta na presença de Mg-ATP, que liga-se entre os monômeros do trímero. Apenas 1 molécula de 2-OG foi encontrada, ligada a volta T de 1 monômero, interagindo com Mg-ATP	2J9C 2J9D, 2J9E	YILDIZ <i>et al.</i> , 2007
P_{II} (planta)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Difração de raios-X/ 1,9	-	Monômeros com 15 kDa. Como nas bactérias, PII de plantas forma trímeros, com 3 voltas T e a extensão N-terminal parece estar envolvida em interações proteína- proteína. Estruturas ligadas a citrato e malonato.	2O66, 2O67	MIZUNO <i>et al.</i> , 2007a
P_{II} (planta)	<i>A. thaliana</i>	Difração de raios-X/ 2,5	NAG, ADP, ATP e arginina	Complexo entre 2 homotrímeros de PII e um hexâmero de NAGK (etapa limitante da biossíntese da arginina) ligado aos metabólitos NAG, ADP, ATP e arginina. A ligação de MgATP estabiliza a volta T.	2RD5	MIZUNO <i>et al.</i> , 2007b
P_{II}	<i>Synechococcus</i> sp. e <i>Synechocystis</i> sp.	Difração de raios-X/ 2,0	-	Mesma topologia conhecidas para outras estruturas de PII	1QY7	XU <i>et al.</i> , 2003
P_{II}	<i>S. elongatus</i>	Difração de raios-X/ 2,75	-	Complexo entre 2 homotrímeros de PII e um hexâmero de NAGK (dímero de trímeros). A volta T ancora NAGK e ativa a enzima.	2JJ4, 2V5H	LLÁCER <i>et al.</i> , 2007
P_{II} (prováve)	<i>Thermotoga maritima</i>	Difração de raios-X/ 2,5	ADP	Monômero de 11,8 kDa, 102 aminoácidos. ADP encontra-se na fenda entre 2 protômeros adjacentes no trímero.	1O51	SCHWARZENBACHER <i>et al.</i> , 2004
GlnK-AmtB	<i>E. coli</i>	Difração de raios-X/2,5	ADP	GlnK interage com AmtB quase que exclusivamente pela superfície externa da volta T, contendo Y51, na face citoplasmática do transportador, com uma estequiometria AmtB ₃ : GlnK ₃ , bloqueando a passagem de amônia.	2NUU	CONROY <i>et al.</i> , 2007

* ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; 2-OG, 2-oxoglutarato ou α -cetoglutarato; NAG, N-acetilglutamato; NAGK, N-acetilglutamato quinase, AmtB, transportador de amônia transmembrana; DraG, glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase.

TABELA 1 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS PII NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EFETORES (CONTINUAÇÃO).

Proteína P _{II}	Microrganismo	Determinação estrutural/ resolução (Å)	Presença de efetores	Considerações	PDB	Referência
P _{II}	<i>S. elongatus</i>	Difração de raios-X/2,2 em alto 2-OG e 1,95 em baixo 2-OG	ATP e 2-OG	Participação do resíduo Lys58 na interação com 2-OG. Comparação da conformação do T-loop com estruturas sem ligante (Xu et al., 2003) e complexadas com NAGK (Llacer et al., 2007)	2XZW, 2XUL, 2XBP	FOKINA <i>et al.</i> , 2010
P _{II} (prováve)	<i>Streptococcus mutans</i>	Difração de raios-X/2,0	-	Hexâmero	3L7P	FAN <i>et al.</i> , 2010, não publicado
P _{II}	<i>Anabaena sp.</i>	Difração de raios-X/1,9		PII adota uma conformação ferredoxin-like. Complexo com PipX (PII interaction protein X) na proporção 3PII: 3 pipX	3N5B	ZHAO <i>et al.</i> , 2010
P _{II} -PipX	<i>S. elongatus</i>	Difração de raios-X/3,2		As regiões de PipX que interagem com NtcA estão protegidas no complexo PII-PipX, que consiste de um trímero PII e três PipX. Assim, o complexo ternário PII-PipX-NtcA não pode ser formado. A estrutura do fator de transcrição NtcA foi feita na presença de 2-OG.	2XG8	LLACER <i>et al.</i> , 2010
GlnK2	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Difração de raios-X /2,35,1,24 para ATP-ligado e 1,48 para ADP-ligado	2-OG, ATP e ADP	O organismo contém 3 proteínas GlnK associadas a AmtB. GlnK2 foi insensível a 2-OG. Não foram observadas grandes diferenças entre as estruturas ligadas a ATP ou ADP e a estrutura na ausência de efetores e os dois nucleotídeos induziram virtualmente as mesmas alterações conformacionais no loop-T.	3NCP, 3NCQ, 3NCR	HELFMANN <i>et al.</i> , 2010
PII	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Difração de raios-X e co-ristalização/1,4 e 2,4 com ATP-ligado	ATP	Pelo menos uma das subunidades apresenta o T-loop ordenado na presença de ATP	3BZQ, 3LF0	SHETTY <i>et al.</i> , 2010

* ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; 2-OG, 2-oxoglutarato ou α -cetoglutarato; NAG, *N*-acetilglutamato; NAGK, *N*-acetilglutamato quinase, AmtB, transportador de amônia transmembrana; DraG, glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase.

TABELA 1 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS P_{II} NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EFETORES (CONTINUAÇÃO).

Proteína P _{II}	Microrganismo	Determinação estrutural/ resolução (Å)	Presença de efetores	Considerações	PDB	Referência
PII	<i>Aquifex aeolicus</i>	Difração de raios-X/1,8			2EG1	SAKAI <i>et al.</i> , 2007 não publicado
GlnZ	<i>A. brasilense</i>	Difração de raios-X/1,4	ATP e 2-OG	ATP e 2-OG ligam em GlnZ pela coordenação com o íon Mg ²⁺ . O sítio de interação de 2-OG envolve o resíduo Lys58 e a cadeia lateral da Gln39, condizente com dados bioquímicos anteriores	3MHY	TRUAN <i>et al.</i> , 2010
PII-like	<i>T. thermophilus</i> HB8	Difração de raios-X/1,93			2CZ4	ARAI <i>et al.</i> , 2006, não publicado
GlnZ	<i>A. brasilense</i>	Difração de raios-X/2,1	ADP	3 monômeros de DraG ligados a 1 trîmero de GlnZ, com ADP ligado em cada sítio em GlnZ. A maior região de contato entre as proteínas não envolve o T-loop	3O5T	RAJENDRAN <i>et al.</i> , 2011
PII	<i>S. elongatus</i>	Difração de raios-X/1,05	ATP, citrato	Mutante PII I86N foi co-cristalizado na presença de ATP, magnésio e citrato. Este mutante liga citrato no lugar de 2-oxo. A ligação de citrato rearranja T-loop e impede a formação do complexo com NAGK, da mesma forma que 2-oxo.	4AFF	ZETH <i>et al.</i> , 2012
GlnK- AmtB	<i>E. coli</i>	Difração de raios-X/1,96	ATP	A uridililação de GlnK impediu a associação com AmtB. ATP aumentou a associação do complexo e 2-OG diminuiu.	2NS1	GRUSWITZ <i>et al.</i> , 2007
GlnK3	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Difração de raios-X/~2	ATP/2-OG, ADP	Ao contrário da GlnK2, a GlnK3 liga ATP/2-OG e ADP para resultar nos estados inativo e funcional, respectivamente.	3TA2/1 , 3T9Z, 3TA0	MAIER <i>et al.</i> , 2011

* ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; 2-OG, 2-oxoglutarato ou α -cetoglutarato; NAG, N-acetilglutamato; NAGK, N-acetilglutamato quinase, AmtB, transportador de amônia transmembrana; DraG, glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase.

2.7.1 Proteínas PII em *Azospirillum brasilense* – GlnB e GlnZ

De Zamaroczy *et al.* (1993) por sequenciamento da região a montante do gene *glnA* (que codifica para GS) propuseram a presença de uma ORF cujo produto apresenta similaridade com a proteína GlnB de *E. coli*, a GlnB. Diferentemente da regulação da GS pela GlnB em *E. coli*, a GlnB de *A. brasilense* parece interferir somente na desadenilação de GS em condições limitantes de nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998). Além disso, a proteína GlnB em *A. brasilense* na sua forma uridililada é necessária para a modulação da atividade de NifA, uma proteína ativadora de transcrição de genes *nif*, provavelmente por interação direta proteína-proteína e não via NtrBC (Figura 6), em resposta à mudanças nos níveis de nitrogênio celular (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1997). GlnB também é requerida para o completo desligamento da nitrogenase (item 2.8) (KLASSEN *et al.*, 2005).

Em 1996, De Zamaroczy e colaboradores descreveram a identificação de uma proteína com 67% de identidade com a GlnB de *A. brasilense*, denominada de Pz (GlnZ em referência ao autor da descoberta) (DE ZAMAROCZY, 1998). Diferentemente do gene *glnK* em vários organismos, *glnZ* não é co-transcrito com *amtB* em *A. brasilense* (HUERGO *et al.*, 2007). A GlnZ também não é requerida para a adenilação da GS. Portanto, neste microrganismo parece não haver o controle da atividade de adenilação da ATase pelas PII e nem da atividade de desadenilação pela GlnZ. O mutante *glnZ* de *A. brasilense* foi capaz de fixar nitrogênio como observado para a estirpe selvagem, o que sugere que GlnZ não tenha a mesma função de GlnB para a regulação de NifA. Em contrapartida, este mutante exibiu uma menor taxa de transporte de amônio que a estirpe selvagem, sugerindo que GlnZ pode atuar na regulação de transportador de amônio AmtB (DE ZAMAROCZY, 1998). Além disso, GlnZ interfere na reativação da nitrogenase, embora não seja essencial para a inativação induzida por amônio (KLASSEN *et al.*, 2001).

2.8 REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DA NITROGENASE

Vários diazotrofos, incluindo proteobactérias, cianobactérias e archeas possuem um sistema regulatório reversível que controla a atividade da nitrogenase em resposta a mudanças ambientais. Este efeito é conhecido como desligamento/religamento da nitrogenase (*switch-off/switch-on*) (NORDLUND; TRIPLETT, 2000; LUDDEN, 1994).

O sistema melhor descrito de regulação pós-traducional da nitrogenase envolve ADP-ribosilação da proteína Fe e tem sido mais estudado nas Alphaproteobactérias *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* e *A. brasilense* (Figura 7). Além destes, análises bioinformáticas sugerem que um mecanismo similar ocorre em pelo menos 25 gêneros de bactérias (HUERGO *et al.*, 2012a). A ADP-ribosilação da proteína Fe é catalisada pelo dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT). A proteína DraT de *R. rubrum* é monomérica com uma massa molecular de 30 kDa, representa 0,002% da proteína total celular e seu único substrato conhecido é a proteína Fe ativa (LOWERY e LUDDEN, 1988). Esta enzima utiliza NAD⁺ como doador de grupo ADP-ribosil para modificar um resíduo conservado de arginina (usualmente Arg101) em uma das subunidade da proteína Fe (LOWERY e LUDDEN, 1988). Essa modificação inativa a proteína Fe e portanto, inibe a nitrogenase. Este grupo ADP-ribosil é removido pela glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase (DraG), promovendo a reativação da nitrogenase (SAARI *et al.*, 1984).

As atividades de DraT e DraG são reguladas de forma oposta *in vivo* (ZHANG *et al.*, 1997). Em resposta a um estímulo negativo, como a presença de íons amônio ou diminuição da energia celular, DraT é ativada e DraG inativada. Nestas condições, ocorre inativação da nitrogenase por ADP-ribosilação da proteína Fe. Quando este estímulo negativo é removido, DraT é inativada e DraG ativada, promovendo a remoção do grupo ADP-ribosil e restaurando a atividade da nitrogenase (HUERGO *et al.*, 2012a; ZHANG *et al.*, 1997).

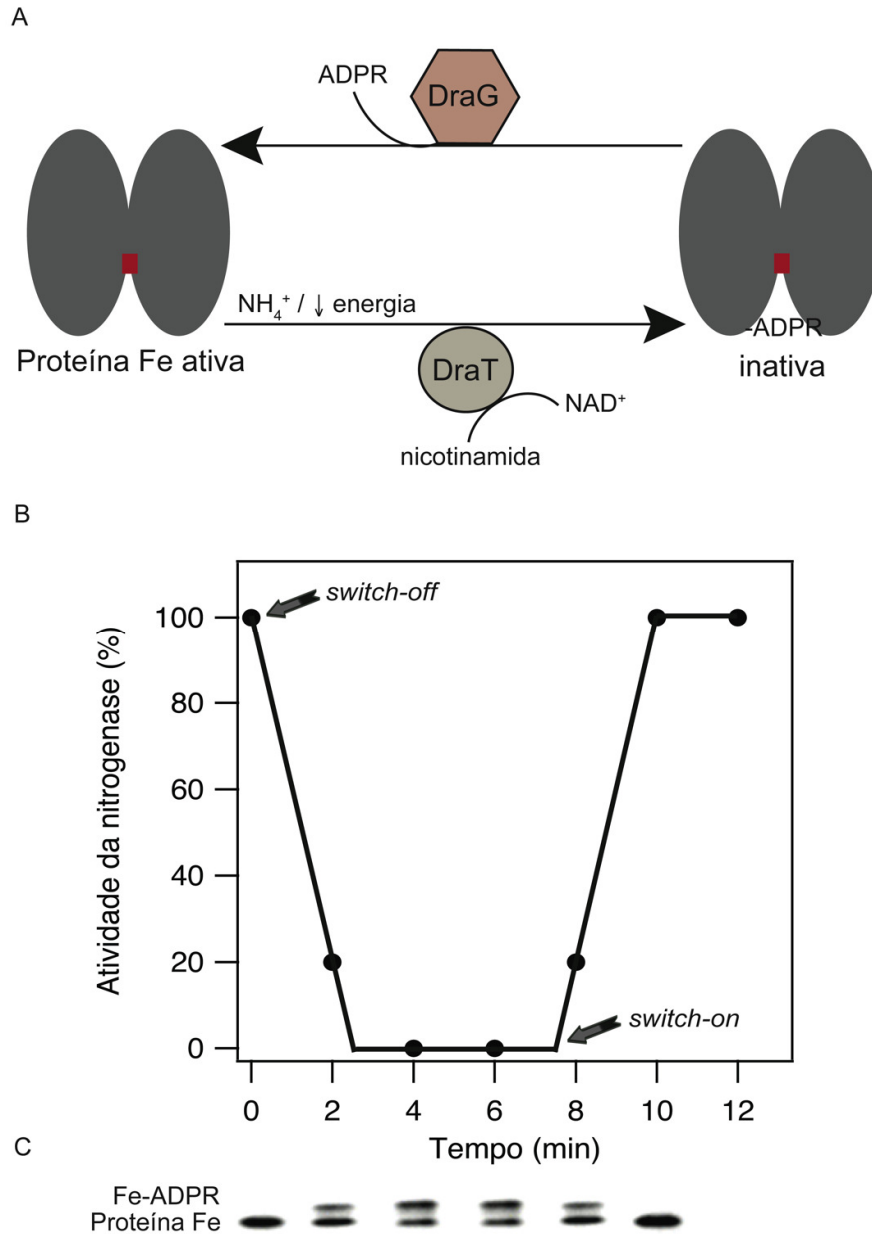


FIGURA 7. REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE POR ADP-RIBOSILAÇÃO REVERSÍVEL

FONTE: Adaptado (HUERGO *et al.*, 2012a).

NOTA: A – Em resposta a presença de íons amônio ou depleção de energia, DraT é ativada para catalisar a ADP-ribosilação da proteína Fe, inativando a nitrogenase; quando o amônio é consumido ou os níveis de energia voltam ao normal, DraG remove o grupo ADP-ribosil, reativando a nitrogenase. B – A modificação pós-traducional da proteína Fe pode ser avaliada pela atividade da nitrogenase, como redução de acetileno ou prótons; os efeitos de *switch-on* ou *-off* estão indicados para representar a inativação e reativação da nitrogenase. C – A ADP-ribosilação ocorre em uma das subunidades da proteína Fe e pode ser avaliada pela separação entre as subunidades modificada (Fe-ADPR) e não modificada.

A via de sinalização que envolve o status de nitrogênio celular na regulação do sistema DraT/DraG em *A. brasilense* e *R. rubrum* tem sido extensivamente estudada e existe participação da família de proteínas responsável pela transdução do sinal de nitrogênio, as proteínas PII (HUERGO *et al.*, 2012a). Além de responder a presença de íons amônio, o sistema DraT/DraG também é responsivo a alterações no sistema energético celular (ZHANG *et al.*, 1993). Em *A. brasilense* a mudança para ambiente anaeróbico ou a mudança para ambiente escuro para a bactéria fotossintetizante *R. rubrum* também causam a inativação por ADP-ribosilação da nitrogenase (NORDLUND e TRIPLETT, 2000; ZHANG *et al.*, 1997).

O efeito estimulante de Mg-ADP para atividade de DraT é conhecido e foi explicado pelo aumento da afinidade de DraT pelo NAD⁺ e pela proteína Fe estar ligada ao nucleotídeo (LOWERY e LUDDEN, 1989; LOWERY *et al.*, 1986). Entretanto, o fato da proteína Fe ter que estar ligada a Mg-ADP para ser substrato parece ser controverso. Mutantes de proteína Fe caracterizados por Seefeldt e colaboradores que apresentaram alteração de ligação a ADP ou ATP (LANZILOTTA *et al.*, 1996; RYLE *et al.*, 1996) mantiveram sua interação com DraT (GRUNWALD *et al.*, 2000). Em um outro trabalho, foi mostrado que além do nucleotídeo ligado a proteína Fe, seu estado de oxidação discrimina entre DraT e DraG (HALBLEIB *et al.*, 2000). A atividade de DraT de *R. rubrum* teve preferência pelo estado oxidado do centro [4Fe-4S] da proteína Fe e ligado a Mg-ADP (HALBLEIB *et al.*, 2000). O estado oxidado da proteína Fe possui maior afinidade por ambos nucleotídeos (ADP e ATP) em comparação com o estado reduzido, o que não explicaria o efeito de Mg-ADP no aumento da atividade de DraT (LANZILOTTA *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem que as alterações conformacionais induzidas pela ligação de nucleotídeos e em resposta ao estado redox na proteína Fe não parecem ser suficientes para discriminar entre DraT e DraG (SCHINDELIN *et al.*, 1997; HALBLEIB *et al.*, 2000). Embora a possibilidade de ligação de ADP a DraT não possa ser negligenciada, não existe evidência direta para isso (ZHANG *et al.*, 2001b). Assim, os dados descritos para explicar como ADP participa da regulação da atividade de DraT ainda não são conclusivos.

DraT foi purificada primeiramente de *R. rubrum* e as frações purificadas, quando analisadas em gel de eletroforese (SDS-PAGE), continham uma banda contaminante com um peso molecular aparente de 12 kDa, o que poderia corresponder ao monômero de proteína PII. Esta banda não foi identificada, mas a posterior tentativa de remoção deste contaminante resultou em perda de atividade de DraT (LOWERY e LUDDEN, 1988).

Anos mais tarde, a interação entre DraT e GlnB em *R. rubrum* e *R. capsulatus*

foi mostrada utilizando sistema de duplo híbrido (ZHU *et al.*, 2006; PAWLOWSKI *et al.*, 2003) e em *A. brasilense in vivo* (HUERGO *et al.*, 2006a) e *in vitro* estimulada por Mg-ADP (HUERGO *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que Mg-ADP regula a atividade de DraT pelo estimular sua interação com GlnB (HUERGO *et al.*, 2009).

2.8.1 Controle do desligamento/religamento da nitrogenase por ADP-ribosilação em *A. brasilense*

Huergo e colaboradores (2009) sugeriram um modelo que explicaria o papel das proteínas PII (GlnB e GlnZ) e AmtB na regulação das enzimas DraT e DraG de *A. brasilense in vitro* em resposta a flutuações nos níveis de amônio extracelular baseado em interações proteína-proteína (Figura 8). Em condição de fixação de nitrogênio, o nível intracelular de glutamina é baixo e existe acúmulo de 2-OG. Além disso, a razão ATP/ADP tem que ser alta para suportar a atividade da nitrogenase. Nesta condição, as PII, GlnB e GlnZ estão completamente uridililadas e se localizam no citoplasma. Na presença de ATP e 2-OG nos respectivos sítios de ligação existe uma provável alteração de conformação que resulta em uma associação fraca DraT-GlnB(UMP₃) e DraG-GlnZ(UMP₃). *In vivo*, a interação DraT-GlnB(UMP₃) não foi observada (HUERGO *et al.*, 2006a). Nesta condição, DraG deve estar ativa para que a nitrogenase esteja ativa. Quando os níveis de amônio extracelular aumentam, a concentração de glutamina aumenta por estímulo da atividade da glutamina sintetase. A glutamina é um efetor positivo da atividade de desuridililação das PII. O influxo de amônio reduz a concentração intracelular de 2-OG, assim como a razão ATP/ADP também é reduzida. Na presença de ADP, GlnB e GlnZ na suas formas completamente desuridililadas permaneceram ligadas a DraT e DraG, respectivamente. Nesta condição a DraT deve estar ativa, catalisando ADP-ribosilação da proteína Fe, inativando a nitrogenase. A interação de GlnB observada com DraT deve regular a atividade de DraT. Além disso, nesta condição, a formação do complexo GlnZ-DraG sugere que ele seja sequestrado para a membrana celular, uma vez que existe a formação de um complexo ternário com AmtB (HUERGO *et al.*, 2007).

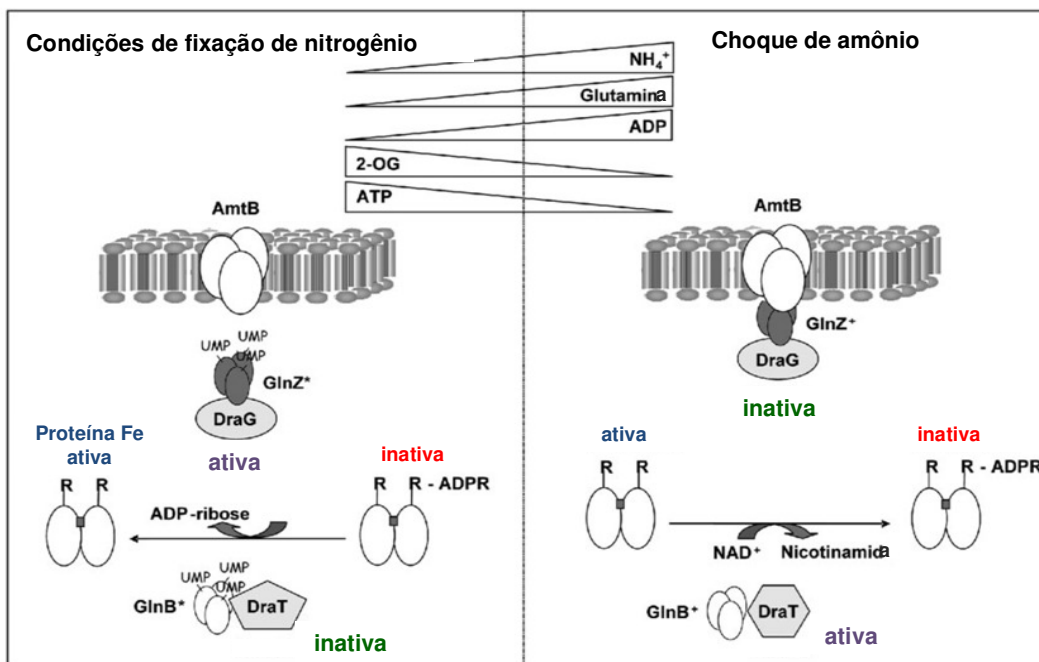


FIGURA 8. MODELO PARA O ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS PII, AmtB, DraT, DraG E EFETORES NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE EM *Azospirillum brasilense*

FONTE: Adaptado (HUERGO *et al.*, 2009).

2.8.2 Outros mecanismos de desligamento da nitrogenase

Outros mecanismos de desligamento da nitrogenase dependente de íons amônio e independentes de ADP-ribosilação vem sendo descritos. Palmitoilação da proteína Fe foi encontrada na cianobactéria *Gleotheca* (GALLON *et al.*, 2000). Em *R. capsulatus* e *A. brasilense*, um outro mecanismo de regulação pós-traducional da nitrogenase também foi descrito, mas seu mecanismo de controle é desconhecido (ZHANG *et al.*, 1996; PIERRARD *et al.*, 1993). Sabe-se que não deve haver modificação covalente dos componentes da nitrogenase, uma vez que na ausência de ADP-ribosilação, esse segundo mecanismo de regulação foi capaz de inibir parcialmente a atividade de nitrogenase. *H. seropedicae* não apresenta o sistema DraT/DraG, mas apresenta desligamento da nitrogenase por íons amônio, com envolvimento de GlnK e AmtB, em uma via de sinalização não completamente entendida (CHUBATSU *et al.*, 2012; NOINDORF *et al.*, 2011)

2.9 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN), assim como a Cristalografia, é uma técnica para a determinação estrutural. A RMN contribui para cerca de 11% de total de estruturas 3D de proteínas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB). A técnica de RMN em solução possibilita, além da determinação estrutural, estudos funcionais destas macromoléculas e estudos de sua dinâmica. Sua ascensão é devida à algumas vantagens em relação à Cristalografia. Primeira, determinação de estruturas protéicas em solução, podendo ser próxima às condições fisiológicas. Segunda, não existe a necessidade de cristalização. Terceira, os estudos em solução permitem a investigação dos mecanismos de dinâmica de proteínas, como as interações transientes proteína-alvo ou efetores e enovelamento protéico transiente. Em contrapartida, a utilização desta técnica apresenta duas grandes limitações. O tamanho da proteína; proteínas grandes (geralmente >50 kDa) podem resultar em baixa resolução dos sinais gerados e a degeneração de ressonância, o que pode impedir o assinalamento correto dos sinais (BILLETTER *et al.*, 2008; DING *et al.*, 2006).

A RMN como todas as formas de espectroscopia, baseia-se da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Entretanto, RMN é uma manifestação do momento angular nuclear ou spin nuclear (I). Os núcleos com número de *spin* diferente de zero, como o ^1H , ^{15}N e ^{13}C , por exemplo, realizam o efeito de ressonância. Este efeito ocorre ao colocar este núcleo em um campo eletromagnético estático muito maior, quando haverá dois tipos de orientação: uma mais favorável, de menor energia, paralela a este campo estático e outra mais desfavorável, de maior nível de energia, orientada no sentido antiparalelo do campo (Fig. 9). Pela distribuição de Boltzmann, a população paralela ao campo magnético externo é ligeiramente maior, de forma que existe a geração de uma resultante no campo magnético no eixo z (M_z). A separação entre os níveis de energia (ΔE) segue a relação $\Delta E = \gamma I h B_0$, onde γ é a taxa magnetogírica, I é o spin nuclear, h é a constante de Plank e B_0 é o campo magnético aplicado. Na espectroscopia de RMN é possível controlar a radiação eletromagnética (faixa de radiofrequência ou RF) e descrever a interação desta radiação com os spins nucleares do sistema. Isto contribui em grande parte para o desenvolvimento do grande número de técnicas utilizadas em RMN. Quando este núcleo é colocado em um campo magnético externo (B_0) e a ele for aplicada uma excitação com frequência igual a sua frequência de precessão (ν_0), tal núcleo é retirado de seu estado de equilíbrio (Fig. 9). Nesta condição o núcleo desejado precessa ao redor do campo

magnético aplicado (B_1) perpendicularmente a B_0 . Este é o efeito da Ressonância Magnética Nuclear. O sinal de ressonância detectado provém da conversão do decaimento da magnetização em função do tempo (FID – *free induction decay*). Este decaimento ocorre de maneira exponencial e é convertido a um domínio de frequências através de uma operação matemática chamada transformada de Fourier (SANDERS e HUNTER, 1993). As diferenças entre as frequências de ressonância entre os núcleos irão depender da chamada blindagem dos núcleos, levando em conta sua vizinhança. Estas diferenças de frequência de ressonância do *spin* são chamadas de deslocamentos químicos. Após a retirada do campo de RF, este núcleo tende a voltar ao seu estado fundamental de equilíbrio através dos processos de relaxação spin-rede (longitudinal, T_1) e relaxação spin-spin (transversal, T_2) (EDWARDS e REID, 2001).

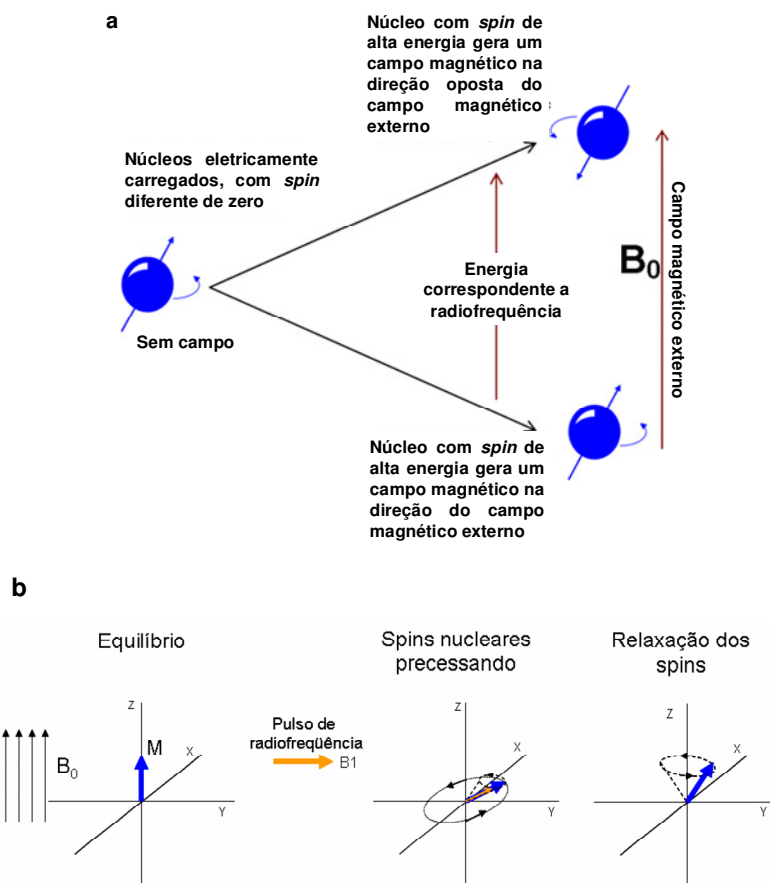


FIGURA 9. PRINCÍPIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

FONTE: Adaptado (RAZZERA, 2009).

NOTA: A - Representação de núcleos com $\frac{1}{2}$. B - Representação simplificada do efeito da aplicação de um pulso de radiofrequência sobre a população de *spins* alinhados a um campo magnético (B_0). O vetor magnetização M representa a resultante das populações de *spins* após a aplicação do campo magnético estático. Esta resultante após a aplicação do pulso passa a precessar sobre B_1 .

2.9.1 Análise conformacional de proteínas por RMN

O objetivo da biologia estrutural é entender a relação entre estrutura protéica e sua função biológica. A determinação estrutural baseada em RMN e difração de raios-X é precisa para a representação molecular da conformação dominante da proteína (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2005). Entretanto, a estrutura protéica não é formada por apenas uma entidade conformacional, mas sim por um conjunto dinâmico de estados conformacionais no estado de equilíbrio. Assim, em um conjunto de condições "nativas", a de menor energia será o estado conformacional mais provável (PALMER *et al.*, 2005). As mudanças conformacionais ocorrem de um estado para outro que se interconvertem em uma ampla escala de tempo: 1 - de pico a

nanossegundos para oscilações e rotações, 2 - entre micro e milissegundos para movimentos de voltas e domínios maiores, como em regulações alostéricas ou interações com ligantes, e 3 - de segundos a horas em movimentos lentos.

Experimentos de relaxação de spin em RMN são capazes de provar e quantificar por diferentes estratégias cada tipo de movimento, caracterizando assim os processos de dinâmica conformacional de proteínas (LINDORFF-LARSEN *et al.*, 2005). Portanto, esta dinâmica de proteínas é requerida para um mais completo entendimento de como os movimentos conformacionais afetam a função das proteínas (KAY, 1998).

O deslocamento químico tem sido amplamente reconhecido como uma medida acurada da conformação molecular, composição e ambiente (WISHART *et al.*, 1991). A correlação do ^1H - ^{15}N , que corresponde ao N amídico, é chamada de impressão digital da proteína, além de ser muito utilizado para proteínas >40 kDa por aumentar em até 10 vezes a resolução dos sinais em comparação com o deslocamento homonuclear ^1H - ^1H (MCINTOSH *et al.*, 1987). Este experimento produz um sinal cruzado para cada par ^1H - ^{15}N na proteína, sendo úteis para o posterior assinalamento da proteína. O assinalamento dos picos é a caracterização da identidade dos núcleos e a posição no espaço, ou seja, identificar de onde veio cada deslocamento químico observado no espectro de ressonância. A partir deste assinalamento, são realizados os experimentos de relaxação de spin em uma faixa de temperatura e cada resíduo de aminoácido é caracterizado quanto ao comportamento dinâmico da proteína, em uma dada escala de tempo, dependendo da mudança conformacional que se quer observar (PALMER, 1997).

Avanços experimentais e teóricos vem sendo feitos para sobrepor a maior barreira da RMN que é a resolução estrutural e conformacional de proteínas de alto peso molecular. Dentre estes, o mais notável tem sido o desenvolvimento da espectroscopia de relaxação transversa otimizada (*transverse relaxation optimized spectroscopy* - TROSY) para minimizar a rápida relaxação transversa normalmente associada com difusão rotacional lenta em sistemas de alto peso molecular (PERVUSHIN, 2001). TROSY pode ser incorporado em várias técnicas de RMN em solução para determinações da relaxação spin, substituindo a *heteronuclear single-quantum correlation* (HSQC) (PALMER *et al.*, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

O controle pós-traducional da nitrogenase por ADP-ribosilação vem sendo estudado por vários anos por diversos laboratórios internacionais. Trabalhos recentes, realizados pelo grupo de fixação biológica de nitrogênio da UFPR em colaboração com o Dr. Mike Merrick do John Innes Centre – Norwich (Inglaterra) e com o grupo do Dr. Fritz Winkler do Paul Scherrer Institut – Villingen (Suíça) proporcionaram um avanço significativo nesta área, incluindo a sugestão de um modelo de regulação para as atividades das enzimas DraT e DraG (HUERGO *et al.*, 2009) e a determinação das estruturas cristalográficas das proteínas DraG e GlnZ complexada a ATP e a 2-oxoglutarato (TRUAN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2009). Contudo, a caracterização funcional e cinética da atividade de DraT na presença da proteína GlnB (uridilada ou desuridilada) e seus efetores ainda não foram estudadas. Rajendran e colaboradores (2011) demonstraram que a GlnZ não foi capaz de regular a atividade de DraG quando foi utilizado um substrato análogo, dansil-arginina-ADP-ribose. Todavia, o controle por GlnZ de DraG utilizando a proteína Fe ADP-ribosilada pode ser diferente e também foi avaliado.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a função das proteínas GlnB e GlnZ de *Azospirillum brasilense* no controle das atividades das proteínas DraT e DraG, respectivamente.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Superexpressar e purificar a proteína GlnB de *A. brasilense*.
- ✓ Realizar análise conformacional da GlnB por RMN.
- ✓ Determinar a temperatura de desnaturação de proteínas PII.
- ✓ Avaliar a ligação de efetores a GlnB por técnicas de RMN.
- ✓ Superexpressar e purificar as proteínas controladoras da atividade de nitrogenase DraT, DraG, e o complexo GlnB-DraT de *A. brasilense*.
- ✓ Superexpressar e purificar as proteínas GlnZ e AmtB, controladoras da atividade de DraG.
- ✓ Purificar a proteína Fe (dinitrogenase redutase) e a proteína MoFe (dinitrogenase) de *A. vinelandii* sob condições anaeróbicas.
- ✓ Caracterizar bioquimicamente a atividade do complexo DraT-GlnB em ensaios de ADP-ribosilação utilizando a proteína Fe como substrato.
- ✓ Caracterizar o núcleo metálico da proteína Fe ADP-ribosilada por espectrometria de ressonância paramagnética
- ✓ Avaliar a transferência de elétrons da proteína Fe ADP-ribosilada para a proteína MoFe por espectrometria UV-Vis sob condições de fluxo interrompido (*stopped-flow*).
- ✓ Caracterizar bioquimicamente a reação de reativação da nitrogenase por DraG utilizando a proteína Fe ADP-ribosilada como substrato.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 BACTÉRIAS E ANTIOTIÓTICOS

As estirpes de bactérias e as respectivas concentrações de antibióticos utilizadas estão apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 - BACTÉRIAS E ANTIBIÓTICOS

Estirpes	Propriedades	Antibiótico (µg/mL)	Referência/Fonte
<i>A. vinelandii</i>			
DJ995	Nif ⁺ , DJ200 x pDB827. Poli-His MoFe. Rif ^S , Km ^S .	-	Laboratório Dennis Dean
DJ884	Nif (lento), mutante sítio-dirigido D187RI. DJ626 x pDB524. Km ^R , Hup ⁻ .	-	Laboratório Dennis Dean
<i>E. coli</i>			
DH10B	galK16 nupG rpsL ΔlacX74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara-leu)7967 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ ⁻	Sm(10)	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	-	Invitrogen Inc.
BL21 (DE3)	<i>lacUV5-T7 gene 1</i> (produtora da RNA polimerase do fago T7)	-	New England Biolabs.
GT1000	<i>rbs lacZ::IS gyrA hutC_K ΔglnKamtB</i>	-	COUTTS <i>et al.</i> , 2002
RB9065(ΔDE3)	<i>glnB2306, glnD99::Tn10</i>	Tc(10)	BENELLI <i>et al.</i> , 2001
<i>A. brasilense</i>			
FP2	Nal ^R Sm ^R Estirpe derivada de SP7 Nif ⁺	Sm(100), Nal(10)	PEDROSA e YATES, 1984
UB2	Nal ^R Km ^R Nif ⁺ <i>draT::km</i>	Nal(2,5), Km(100)	ZHANG <i>et al.</i> , 1992
UB4	Nal ^R Km ^R Nif ⁺ <i>draG::km</i>	Nal(2,5), Km(100)	ZHANG <i>et al.</i> , 1992

* Sm = estreptomina, Km = canamicina, Rif = rifampicina, Nal = ácido nalidíxico. ^R = resistente; ^S = sensível.

5.2 PLASMÍDEOS

A Tabela 3 apresenta os plasmídeos utilizados neste trabalho.

TABELA 3 - PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Genótipo	Referência/Fonte
pLH25	Km ^R , expressa GlnB de <i>A. brasilense</i> . Vetor pET28a.	HUERGO <i>et al.</i> , 2005a
pMSA4	Km ^R , expressa GlnZ de <i>A. brasilense</i> . Vetor pET28a.	MOURE <i>et al.</i> , 2012
pLHPETDraT	Km ^R , expressa DraT-His de <i>A. brasilense</i> . Vetor pET28a	HUERGO <i>et al.</i> , 2005b
pLHDK5pII	Amp ^R , expressa GlnB de <i>A. brasilense</i> . Vetor pDK5.	HUERGO <i>et al.</i> , 2005a
pGlnBΔ42-54	Km ^R , expressa GlnB de <i>A. brasilense</i> com deleção na volta T (Δ42-54). Vetor pET28a.	MOURE <i>et al.</i> , 2013
pGlnDHis	Km ^R , expressa GlnD com cauda His N-terminal de <i>A. brasilense</i> . Vetor pET28a.	ARAÚJO <i>et al.</i> , 2008
pLHPETHisDRAG	Km ^R , expressa His-DraG de <i>A. brasilense</i> . Vetor pET28a.	HUERGO <i>et al.</i> , 2005b

5.3 MEIOS DE CULTURA

5.3.1 Meios para o cultivo de *A. brasilense*

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFbHP (MACHADO *et al.*, 1991). A composição e o preparo do meio NFbHP estão descritos abaixo.

	gramas/litro
KH ₂ PO ₄	4,0
K ₂ HPO ₂	6,0
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
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻²
Lactato de sódio	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
ZnSO ₂ · 7H ₂ O	2,4 · 10 ⁻⁴

Como fonte de nitrogênio para crescimento das estirpes foi utilizado NH₄Cl 20 mM. As soluções de fosfatos e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento de uso. Quando completo, o meio de cultura apresentou pH 6,8 e passou a ser denominado NFbHP. O meio NFbHP sólido foi obtido adicionando-se ágar bacteriológico na concentração de 15 g/L ao meio líquido. Dez por cento da mistura de fosfato foi adicionada ao meio sólido antes da autoclavação para evitar hidrólise do ágar devido a possíveis variações no pH.

5.3.2 Meios para o cultivo de *A. vinelandii*

As estirpes de *A. vinelandii* utilizadas neste trabalho (Tabela 2) foram cultivadas em meio de Burk (STRANDBERG e WILSON, 1968). O meio sólido continha 1,6% de ágar.

Soluções estoque para o preparo do meio:

A – Solução de Sais (10x)

sacarose	200 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,9 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 g/L

B – Solução de molibdato sódico (10 mM)

C – Tampão fostato (100x)

K ₂ HPO ₄	80 g/L
KH ₂ PO ₄	20 g/L

D – Uréia (5 M)

E – Citrato de amônio férrico (300 mM)

Para o crescimento das estirpes de *A. vinelandii*, 500 mL de meio foram preparados com 5mL 100x solução PO₄, 50 mL 10x solução de sais e 1 mL uréia 5 mol/L. Para expressão da nitrogenase, 10 mM de molibdato sódico foi adicionado a solução de sais (10x) e citrato de amônio férrico foi adicionado a uma concentração final de 15 µM na ausência de uréia.

5.3.3 Meios para cultivo de *E. coli*

Os meios de cultura líquidos utilizados no cultivo das estirpes de *E. coli* foram Luria-Broth (LB) ou meio mínimo M9 (contendo NH₄Cl ou glutamina).

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

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

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

Para expressão da proteína GlnB foi utilizado um meio mínimo M9 modificado (TUGARINOV *et al.* 2006) preparado no momento do uso com as seguintes soluções:

Solução A

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	64 g/L
K ₂ HPO ₄	15 g/L
NaCl	2,5 g/L

O pH foi ajustado para 7,35 com HCl

Solução B

MgSO ₄	1 mol/L
-------------------	---------

Solução C

glucose	20%
---------	-----

Filtrada em membrana Millipore 0,22 µm

Solução D

CaCl ₂	1 mol/L
-------------------	---------

Solução E

Tiamina	10 mg/mL
---------	----------

filtrada em membrana Millipore 0,22 µm

Solução F

NH_4Cl ou $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}^*$ 25 g/L

As soluções foram autoclavadas separadamente, à exceção das soluções C e E. Estas soluções foram misturadas para o preparo do meio no momento do uso nas seguintes proporções:

Solução	Para 1 L de meio
A	200 mL
B	2 mL
C	20 mL
D	100 μL
E	1 mL
F	40 mL
H ₂ O	738 mL

Para a expressão de His-AmtB foi utilizado meio M9 como descrito acima, mas contendo glutamina 20 mg/mL.

5.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C. As culturas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120 rpm (ou 200 rpm em meio mínimo). As células de *E. coli* foram mantidas em glicerol 50% e mantidas em estoque a -20°C.

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFbHP contendo antibióticos adequados. As culturas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120 rpm até que a D.O.₆₀₀ (densidade óptica a 600 nm) necessária fosse atingida. Os estoques de *A. brasilense* foram mantidos em meio sólido a temperatura ambiente.

As estirpes de *A. vinelandii* foram cultivadas a 30°C. As culturas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 200 rpm. As células de *A. vinelandii* foram mantidas em DMSO 7% a -80°C.

5.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

5.5.1 Transformação de células quimicamente competentes

Para induzir competência quimicamente, algumas colônias de *E. coli* em meio LA foram inoculadas em 5 mL de meio LB na presença de antibióticos e incubadas sob agitação por cerca de 16 horas a 37°C. Todo o pré-inóculo foi transferido para um frasco de 1L contendo 250 mL de LB mais antibióticos e a cultura foi incubada a 37°C até atingir densidade D.O.₆₀₀ entre 0,3 e 0,4. As células foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo então ressuspensas em 60 mL de uma solução gelada de MgCl₂ 0,1 M. Após 3 a 5 minutos no gelo as células foram coletadas por centrifugação. As células foram gentilmente ressuspensas em 12 mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1M e depois mais 30 mL de CaCl₂ 0,1M foram adicionados. A ressuspensão foi mantida em gelo durante 30 min. As células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 5 mL de solução de CaCl₂ 85 mM contendo 15% de glicerol. Frações de 100 µL foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C.

Para a transformação, as alíquotas de células foram retiradas do freezer -70°C e mantidas no gelo por 30 minutos. Dez µL da reação de ligação foram misturados com as células, mantendo-se no gelo por 30 minutos, seguido de incubação a 42°C por 90 segundos. As células foram imediatamente transferidas para o banho de gelo por mais 90 segundos. A esta mistura, foram adicionados 1 mL de meio LB e esta suspensão foi mantida a 37°C por 1 hora. Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados.

5.6 SUPER-EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS GlnZ, GlnB, DraG, DraT E AmtB DE *A. brasilense*

5.6.1 Super-expressão das proteínas PII, GlnB e GlnZ

A expressão das proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* foi realizada em células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pLH25 ou pMSA4, que expressam as proteínas na sua forma nativa. Aproximadamente 5 colônias de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo foram inoculadas em 10 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e o pré-inóculo foi incubado durante a noite (16 horas) em agitador rotatório a 37°C e 200 rpm na presença de canamicina. Para as análises de

RMN, a GlnB foi expressa em meio mínimo marcado com $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e $^2\text{H}_2\text{O}$ (item 5.6.1.1). A 500 mL de meio LB contendo 40 mM cloreto de amônio, 5 mL do pré-inóculo foram adicionados. As células foram incubadas a 37°C sob agitação de 200 rpm até D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,7. Neste momento foi adicionado IPTG 0,3 mM e a cultura foi incubada por 4 horas a 37°C sob agitação. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e as células foram armazenadas a -80°C .

5.6.1.1 Super-expressão de GlnB duplamente marcada com ^{15}N e ^2H

A superexpressão da proteína GlnB nativa de *A. brasilense* duplamente marcada (^{15}N , ^2H) em *E. coli* BL21 (DE3) para análises por RMN foi realizada baseado no protocolo descrito por Tugarinov *et al.* (2006). O pré-inóculo foi preparado com algumas colônias em 5 mL meio LB contendo canamicina, mantido sob agitação a 200 rpm a 37°C até uma D.O.₆₀₀ entre 0,7 e 0,8. O pré-inóculo foi centrifugado e as células foram inoculadas em 20 mL de meio mínimo para uma D.O.₆₀₀ de 0,05-0,1. Esta cultura foi mantida sob agitação a 37°C até uma D.O.₆₀₀ de 0,6. As células foram novamente coletadas por centrifugação e ressuspensas em 50 mL de meio mínimo contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (20 mM) como fonte de nitrogênio e preparado com D_2O , obtendo uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,1. A cultura foi incubada sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 16h, até uma D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,5. Esta cultura foi diluída para 100 mL de meio mínimo contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e preparado com D_2O , e mantida sob agitação a 37°C até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,5. A cultura foi novamente diluída para 500 mL com o mesmo meio e incubada sob agitação a 37°C até uma D.O.₆₀₀ entre 0,7 e 0,8, quando foi adicionado IPTG (concentração final 0,4 mM) e incubada por mais 18 horas a 37°C para induzir a expressão da proteína. As células foram coletadas por centrifugação e utilizadas para purificação GlnB marcada com ^{15}N e ^2H .

5.6.2 Super-expressão de DraT e do complexo DraT-GlnB

A expressão da proteína DraT de *A. brasilense* foi realizada utilizando células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pLHPETDraT, que expressa a proteína DraT, fusionada com uma sequência de aminoácidos contendo 6 histidinas localizadas na porção N-terminal das proteínas, denominada His-DraT conforme Huergo *et al.* (2005b). Duzentos mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1:100 com uma cultura crescida durante a noite. As células cultivadas a 37°C sob agitação até

D.O.₆₀₀ de 0,5. Neste momento foi adicionado IPTG 0,5 mM e a cultura foi incubada durante a noite a 16°C sob agitação. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e as células foram armazenadas a -80°C.

A expressão do complexo DraT-GlnB de *A. brasilense* foi realizada em células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo os plasmídeos pLHPETDraT e pDK5GlnB, que expressam a proteína DraT-His e a proteína GlnB nativa, respectivamente. Duzentos mililitros de meio LB foram inoculados com 2 mL de uma cultura crescida durante a noite e incubados a 37°C sob agitação até D.O.₆₀₀ de 0,7. Neste momento foi adicionado IPTG (0,4 mM) e a cultura foi incubada por mais 5 horas a 30°C sob agitação. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e as células armazenadas a -80°C.

5.6.3 Super-expressão de DraG

A expressão da proteína DraG de *A. brasilense* foi realizada em células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pLHPETHisDRAG, que expressa a DraG fusionada 6 histidinas na porção N- terminal (His-DraG). Para a expressão de His-DraG, 20 mL de cultura em meio LB foram crescidos 16 horas. Essa cultura foi utilizada para inocular 1000 mL de meio LB na presença de 40 mM cloreto de amônio para evitar a expressão de *glnK* de *E. coli*. As células foram mantidas a 37°C e 150 rpm até D.O.₆₀₀ de 0,4. Neste momento, foi adicionado IPTG (0,3 mM) e a cultura foi incubada por 20 horas a 20°C sob agitação. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C e as células armazenadas a -80°C.

5.6.4 Super-expressão de AmtB

A expressão da proteína His-AmtB (fusionada a 6 histidinas) de *A. brasilense* foi realizada em células de *E. coli* GT1000 contendo o plasmídeo pLHDK7HisAmtB. Para a expressão de His-AmtB, 16 mL de cultura em meio LB cultivada durante a noite foram utilizados para inocular 800 mL de meio M9 contendo glutamina (20 mg/mL). As células foram mantidas a 37°C a 180 rpm e após 2 horas foi adicionado IPTG (0,3 mM). Após indução por 16 horas, as células foram coletadas por centrifugação e mantidas a -80°C.

5.6.5 Super-expressão de GlnD

A expressão da proteína GlnD de *A. brasilense* foi realizada na estirpe de *E. coli* estirpe RB9065(λ DE3) (duplo mutante *glnBglnD* e expressa T7 RNA polimerase) contendo o plasmídeo pGlnDHis, que expressa a GlnD de *A. brasilense* fusionada a 6 histidinas (GlnD-His). A indução de GlnD-His foi realizada como descrito para AmtB-His. Após centrifugação, as células foram armazenadas a -80°C .

5.7 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Fe E MoFe DE *A. vinelandii*

As estirpes de *Azotobacter vinelandii* DJ995 e DJ884 foram utilizadas para expressar a proteína MoFe com cauda de histidina e a proteína Fe nativa, respectivamente. Inicialmente, a bactéria foi cultivada durante 16 h em 500 mL de meio BN, contendo 5mL 100x solução fosfato e 1 mL uréia 5 mol/L. Após o crescimento, a densidade óptica a 600 nm foi determinada para que a quantidade necessária de inóculo fosse adicionada a cada frasco contendo 500 mL de meio fresco. Por exemplo, quando a $D.O_{.600}$ foi de aproximadamente 1,0, 23 mL do pré-inóculo foram adicionados a 3 frascos de 500 mL de meio cada um. Após aproximadamente 8 horas de cultivo a 30°C e 300 rpm, a $D.O_{.600}$ foi novamente determinada. Da mesma forma que anteriormente, quando a $D.O_{.600}$ estava até 0,7, 3 frascos de 500 mL cada foram utilizados para inocular 50 L de meio contendo 5L of 10x solução de sais; 5mL de 10 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 500 mL 100x solução fosfato; 100 mL de 5 M uréia; 2, 5 mL de solução 300 mM citrato de amônio férrico (filtrada em membrana Millipore 0,22 μm) e 43 L de água. Após incubação por aproximadamente 16 h ($D.O_{.600}=1,5-1,9$), a 30°C , 200 rpm e 850 m^3/min de aeração, as células de 40 L de cultura foram coletadas por filtração *cross-flow* e ressuspensas em 40 L de novo meio na ausência de uréia, juntamente com os 10 L restantes da cultura de 50 L anterior e incubadas por mais 4 horas a 30°C e 200 rpm. Esta etapa corresponde a desrepressão da nitrogenase. Em seguida células foram coletadas por filtração *cross-flow*, pesadas e mantidas a -80°C .

5.8 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

5.8.1 Proteínas PII

A purificação da GlnB foi realizada como descrito por Huergo *et al.* (2007) e Inaba (2009), com modificações. Após a lise por sonicação das células, o extrato foi centrifugado (15000 rpm, 4°C, 30 minutos) e o sobrenadante (fração solúvel) foi utilizado para purificação. Dois protocolos de purificação foram utilizados: (a) a fração solúvel (FSa) foi submetida a cromatografia em coluna Hi-Trap Heparin (5 mL; GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 100 mM KCl); e (b) a fração solúvel foi submetida a tratamento térmico a 70 ou 80°C por 15 min, incubada em banho de gelo por mais 15 min e então centrifugada. Esta fração solúvel (FSb) foi então submetida a cromatografia em coluna Hi-Trap Heparina como no procedimento (a). Para eluição da proteína GlnB foi utilizado um gradiente não linear de KCl com tampão B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 1 M KCl) em ambos casos. As frações coletadas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) ou Tris-Tricina (SCHAGGER e von JAGOW, 1987) e os géis foram corados com Coomassie Blue. A proteína GlnB foi eluída entre 120 e 320 mM de KCl. Quando necessário, as proteínas foram dialisadas contra tampão A contendo ou não glicerol 30%.

5.8.2 Purificação da proteína DraT

A proteína DraT com uma sequência de 6 histidinas na porção N-terminal (His-DraT) foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna IMAC (cromatografia de afinidade com metal imobilizado, Sigma) de 2 mL pré-carregada com NiCl₂, como descrito por Huergo *et al.* (2005b). Após a lise por sonicação das células, o extrato foi centrifugado (15000 rpm, 4°C, 30 minutos) e o sobrenadante (fração solúvel) foi utilizado para purificação. A coluna foi equilibrada com 5 mL do tampão de sonicação de DraT (50 mM Tris-HCl pH 8, NaCl 200 mM e glicerol 10%). Aproximadamente 20 mL do extrato livre de células foram aplicados na coluna que foi lavada com 10 mL de tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10% glicerol e 10 mM de imidazol). A eluição da DraT foi realizada com 5 mL de cada tampão contendo as seguintes concentrações de imidazol: 50, 100, 200, 300, 400 ou 500 mM. As frações coletadas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e utilizadas em seguida.

5.8.3 Purificação do complexo DraT-GlnB

O complexo foi purificado como descrito por Huergo *et al.* (2009), utilizando uma coluna IMAC de 5 mL pré-carregada com NiCl_2 e acoplada a uma bomba peristáltica. O complexo foi eluído em gradiente não linear de imidazol (10, 50, 100, 300 e 500 mM), utilizando 2 volumes de coluna para cada etapa. As frações de maior grau de pureza foram reunidas e dialisadas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% glicerol, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0,5 mM ADP e 0,05% Tween 20. Em seguida foi realizada uma cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 200 (320 mL) utilizando o tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% glicerol, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0,5 mM ADP e 0,05% Tween 20. As frações contendo o complexo DraT-GlnB na razão molar 1:1 com maior atividade pela determinação da porcentagem de ADP-ribosilação da proteína Fe foram reunidas e utilizadas para os ensaios.

5.8.4 Purificação da proteína DraG

A proteína DraG contendo 6 resíduos de histidina na extremidade N-terminal (His-DraG) foi purificada por cromatografia de afinidade conforme Huergo *et al.* (2005b). A coluna HiTrap Chelating- Ni^{+2} (GE Healthcare) de 1 mL acoplada a uma bomba peristáltica foi carregada com NiCl_2 como recomendada pelo fabricante. A coluna foi equilibrada com 5 mL do tampão 1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M NaCl; glicerol 10%) e, em seguida, 20 mL do extrato livre de células foram aplicados na coluna, que então foi lavada com 2 mL de tampão 1 e 10 mL de tampão 2 (tampão 1 contendo 10 mM de imidazol). A eluição da proteína His-DraG foi realizada com 5 mL de cada solução tampão 1 contendo diferentes concentrações de imidazol: 50, 100, 300 e 500 mM. Foram coletadas frações de 1 mL, que foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. As frações solúveis com maior grau de pureza foram agrupadas, dialisadas, aliquoteadas e armazenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

5.8.5 Purificação da proteína AmtB

A purificação da proteína His-AmtB (contendo 6 resíduos de histidina na extremidade N-terminal) foi realizada como descrito por Rodrigues *et al.* (2011). As células foram ressuspensas em 20 mL de tampão 1 contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10% glicerol e 1% (m/v) Triton X-100 e depois lisadas por sonicação. O extrato foi clarificado por centrifugação 30.000g por 20 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O

sobrenadante foi aplicado em coluna HiTrap Chelating de 1 mL carregada com solução de NiCl_2 e pré-equilibrada com 5 mL de tampão 1. A proteína foi eluída utilizando um gradiente não linear utilizando 5 volumes de coluna de tampão 1 contendo 10, 50, 300 ou 500 mM de imidazol. As frações contendo His-AmtB foram reunidas, dialisadas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 50% glicerol e 0,05% Triton X-100 e mantidas a -80°C .

5.8.6 Purificação da proteína GlnD

A purificação da GlnD-His foi realizada conforme descrito por Araujo *et al.* (2008). As células de *E. coli* expressando GlnD-His foram ressuspensas em tampão S (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM DTT e 10% glicerol) e lisadas por sonicação. O extrato bruto foi clarificado por centrifugação a 10000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna HiTrap Chelating de 1 mL carregada com solução de NiCl_2 e pré-equilibrada com tampão S. A coluna foi lavada com tampão W (50 mM Tris-HCl, pH 6,3, 500 mM NaCl) contendo imidazol 10 mM e, em seguida, com o mesmo tampão contendo 40 mM de imidazol. As proteínas foram eluídas com um gradiente não linear de imidazol (50, 100, 300 e 500 mM) em tampão contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl e 10% glicerol, utilizando 5 volumes de coluna para cada concentração.

5.8.7 Purificação das proteínas Fe e MoFe

A proteína MoFe foi purificada da estirpe de *A. vinelandii* DJ995 e a proteína Fe da estirpe DJ884, utilizando protocolos descritos com modificações (CHRISTIANSEN *et al.*, 1998; SEEFELDT e MORTENSON, 1993). As estirpes bacterianas foram cultivadas como descrito no item 5.7 células foram crescidas, coletadas e armazenadas a -80°C . Para purificação das duas proteínas estruturais da nitrogenase todas as soluções utilizadas foram submetidas a um processo de degaseificação com 3 ciclos de vácuo de 15 min, intercalados por pressão positiva de argônio durante 1 min e posteriormente mantidas em condições redutoras com ditionito e na ausência de oxigênio. As células foram lisadas por choque osmótico quando ressuspensas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 4 M glicerol (240 mL para cada 60 g de células), suspensão foi então centrifugada a 8000 rpm por 25 min. Aproximadamente 200 mg de DNase foram adicionados em cada tubo e as células foram ressuspensas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (aproximadamente 250 mL). Após esta etapa, o

extrato foi mantido em gelo por 10 min e então foi submetido a centrifugação a 18900 rpm por 40 min a 4 °C. Ao sobrenadante foi adicionada 30 mL de uma solução de 1M Tris-HCl pH 8,0 contendo 29 g de NaCl e 400 mg de ditionito e submetido a várias etapas de vácuo e pressão positiva de argônio antes de ser submetido a cromatografia.

A estirpe DJ995 expressa a proteína MoFe com uma cauda de histidina na subunidade α , que permite a purificação por cromatografia de afinidade por metal. O extrato celular obtido como descrito acima e contendo MoFe foi aplicado em uma coluna de afinidade IMAC de 60 mL carregada com 275 mL de solução 100 mM $ZnSO_4$, utilizando uma bomba peristáltica. A coluna foi lavada com 2 volumes de coluna com um tampão contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 mM ditionito e 20 mM imidazol. As proteínas que permaneceram ligadas a coluna foram eluídas com gradiente linear de imidazol em um sistema de purificação Äkta (GE Healthcare, USA). As frações com maior intensidade de cor coletadas em concentração de aproximadamente 250 mM NaCl foram reunidas e diluídas 8 vezes em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 1 mM ditionito. Esta fração diluída foi, então, aplicada em uma coluna de Q-sepharose (60 mL) pré-equilibrada com 100 mL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl e depois com 200 mL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e as proteínas foram eluídas com gradiente linear de NaCl (100-300 mM em 5 volumes de coluna). As frações correspondentes a MoFe purificada foram reunidas e concentradas em Amicon com membrana com *cutoff* de 100 kDa (YM100) e mantidas em nitrogênio líquido.

A estirpe DJ884 expressa a proteína Fe selvagem. O sobrenadante foi aplicado utilizando uma bomba peristáltica em uma coluna de Q-sepharose (150 mL) pré-equilibrada com 100 mL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl e depois com 200 mL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, todos contendo 1 mM ditionito. A coluna foi lavada com 1 volume de coluna com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 1 mM ditionito. As proteínas que permaneceram ligadas a coluna foram eluídas com quatro volumes de coluna com gradiente linear de NaCl (200-500 mM) em um sistema de purificação Äkta (GE Healthcare, USA). As frações correspondentes a proteína Fe, eluídas com aproximadamente 350 mM, foram aplicadas em uma outra coluna Q-sepharose (40 mL), também pré-equilibrada, para concentração da amostra. Para isso, a amostra foi aplicada, a coluna lavada com 50 mL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, o fluxo foi revertido, e a proteína foi eluída com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M NaCl, ambos contendo 1 mM ditionito. Esta fração concentrada foi, então, aplicada em uma coluna de Sephacryl 200 (600 mL) pré-equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl

pH 8,0, 500 mM NaCl, que também foi o tampão de eluição da coluna de gel filtração. As frações correspondentes a Fe purificada foram reunidas e concentradas em Amicon com membrana com *cutoff* de 30 kDa (YM30) e mantidas em nitrogênio líquido.

5.9 ANÁLISE DE PROTEÍNAS

5.9.1 Eletroforese de proteínas

As amostras protéicas foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12 ou 15% contendo glicina e SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) ou em gel de poliacrilamida 12% contendo Tricina e SDS (SCHAGGER e von JAGOW, 1987), que permite separar proteínas com massa molar de 1 a 100 kDa com alta resolução. As proteínas foram visualizadas após a coloração com Coomassie Blue, registrada utilizando um sistema de fotodocumentação Biochemi (UVP). Para análise densitométrica dos géis foi utilizado o programa ImageQuant ou Photoshop CS4.

5.9.2 Eletroforese de proteínas sob condições nativas

As condições de eletroforese não-desnaturantes foram realizadas conforme descrito por Huergo (2006). As amostras utilizadas nos experimentos foram diluídas em tampão de amostra contendo 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol e 0,005% azul de bromofenol. A concentração do gel separador foi de 7,5% de acrilamida, 0,45 M TrisHCl, pH 8,8, 5 µL de TEMED, 0,05% persulfato de amônio (m/v). As eletroforeses foram realizadas a 100 V por 4 horas, em tampão contendo Tris base e glicina (tampão Tris 3 g/L; glicina 14,4 g/L).

5.9.3 Determinação de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas segundo o método de Bradford (1976), biureto (CHROMÝ *et al.*, 1974) ou BCA (SMITH *et al.*, 1985). Albumina bovina foi utilizada como padrão.

5.9.4 Western Blot

O *Western blot* foi realizado como descrito por Huergo *et al.* (2006b) utilizando anticorpo anti-NifH (HUERGO *et al.*, 2005b) e sistema ECL (GE HealthCare). A revelação procedeu-se em filme de raio-X (GE Healthcare).

5.10 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE *MELTING*

Para os experimentos de determinação da temperatura de *melting* foi utilizado tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5 para proteínas PII ou água para lisozima. As proteínas PII ou lisozima (Sigma) foram utilizadas em uma concentração final de 10 μ M. As proteínas PII de *Herbaspirillum seropedicae* e *E. coli* foram gentilmente cedidas por Marco A. S. Oliveira. O corante Sypro Orange (Invitrogen) foi utilizado em uma concentração final de 5x (1000 vezes diluído). As amostras foram preparadas em placas de 96 poços, a fluorescência foi mensurada a cada aumento na temperatura de 0,3 - 1 °C na faixa de 25 a 99,9°C no equipamento Step One Plus RT-PCR (Life Technologies) e analisadas no software Step One v.2.0. A temperatura de *melting* (T_m) foi determinada como a temperatura máxima da primeira derivada das curvas de *melting* ou desenovelamento, o que corresponde a metade da fluorescência máxima da amostra.

5.11 ENSAIOS DE URIDILILAÇÃO

Os ensaios de uridililação *in vitro* foram realizados como descrito por Araujo *et al.* (2008) utilizando 3 μ mol/L de proteína PII, 100 nM GlnD-His de *A. brasilense*, 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT, 0,2 mM ATP, 10 mM 2-oxoglutarato e 2 mM UTP. A reação ocorreu por 30 minutos a 30°C. A GlnD-His foi removida com resina Magne-His. As proteínas GlnB e GlnZ uridililadas foram submetidas a diálise em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl e 20% glicerol. O perfil de uridililação foi avaliado em gel nativo (7,5%).

5.12 FORMAÇÃO DE HETEROTRÍMEROS

As proteínas purificadas GlnZ e GlnZ-UMP₃, preparadas como descrito por Araujo *et al.* (2008) e gentilmente cedidas por Luíza M. Araújo para este experimento, foram misturadas em uma razão 1:1 em tampão 50 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM KCl.

As amostras foram mantidas a 40, 50, 60, 70 e 80°C por 5 minutos em termociclador e posteriormente incubadas 5 minutos em gelo. As amostras foram analisadas por eletroforese em condição nativa.

5.13 ATIVIDADE DA DraT

Os ensaios de ADP-ribosilação foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Moure *et al.* (2013), que corresponde ao ensaio de atividade de DraT indireto, uma vez que a atividade da nitrogenase foi determinada pela produção de H₂. Para este ensaio, os *vials* foram selados com tampa de borracha e metal e as soluções foram previamente submetidas ao processo de desgaseificação. Como protocolo padrão foi utilizado um tampão contendo 20 mM MOPS pH 7,5, 2 mM NAD⁺, 1 mM ADP, 1 mM MgCl₂ e diferentes quantidade de DraT complexada ou não com proteínas PII ou complexo co-purificado DraT-GlnB. Esta solução foi submetida ao processo de desgaseificação. Separadamente, o ditionito foi removido da amostra de proteína Fe em uma coluna de 3 mL de Sephadex G-25 em Glove Box (HALBLEIB *et al.*, 2000). A solução na ausência de oxigênio foram adicionados 100 µg de proteína Fe na ausência de ditionito (portanto, considerada oxidada) para um volume final de 500 µL. A reação foi incubada a 30°C a 120 rpm durante 5 min. Após este tempo, a reação foi parada com a adição de 500 µL de um tampão para atividade da nitrogenase *in vitro* contendo 200 mM MOPS pH 7,0, 13,4 mM MgCl₂, 60 mM fosfocreatina, 10 mM ATP, BSA 2,3 mg/mL, creatina fosfoquinase 0,4 mg/mL e 30 mM ditionito (LOWERY *et al.*, 1986). O ditionito reduz o substrato para DraT, NAD⁺, parando a reação. Para determinar a atividade da nitrogenase, 500 µg de proteína MoFe foram adicionados em cada reação, que foram incubadas 8 min, 130 rpm a 30°C. O ensaio de nitrogenase foi parado com a adição de 300 µL EDTA 400 mM. A produção de H₂ foi, então, quantificada por cromatografia gasosa em coluna Molecular Sieves 5A em cromatógrafo gasoso Varian 450.

O padrão de ADP-ribosilação também foi avaliado em gel low-crosslinker (172 acrilamida: 1 bisacrilamida) SDS-PAGE (12%), como descrito por (KANEMOTO e LUDDEN, 1984).

Após a ADP-ribosilação da proteína Fe catalisada pelo complexo DraT-GlnB na presença de NAD⁺ ter sido confirmada como causa da inibição da atividade da nitrogenase, a porcentagem de ADP-ribosilação foi determinada pela porcentagem de atividade da proteína Fe inibida e este dado foi utilizado para expressar a atividade de DraT.

5.14 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As amostras de GlnB marcada (^{15}N , ^2H) foram utilizadas na concentração de 33 μM , considerando o trímero, em tampão 50 mM Tris-HCl pH7,5, 100 mM KCl e 10% D_2O . Os dados de ressonância foram obtidos a 25°C (a menos que indicado) em espectrômetros Bruker Avance de 600 MHz ou Bruker Avance III de 800 MHz, no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (Rio de Janeiro, RJ). Os espectrômetros são equipados com sondas de tripla ressonância de 5 mm. Os deslocamentos químicos de ^1H foram referenciados para o DSS (ácido 5-sulfônico 2,2-dimetilsilapentano) enquanto que ^{15}N foi referenciado utilizando razões de frequência absoluta (WISHART *et al.*, 1995). A conformação protéica foi monitorada por experimentos ^1H - ^{15}N – TROSY. O estudo do efeito da temperatura sob a estabilidade conformacional da proteína GlnB de *A. brasilense* foi realizado por experimentos 1D ^1H nas temperaturas de 25, 35, 50, 60, 70 e retorno para 25°C, com mesma amostra. Todos os espectros foram processados utilizando Topspin 2.0 (Bruker).

5.14.1 Ligação dos efetores a proteína GlnB

Os efetores 2-oxoglutarato (2-OG, Sigma), ATP (Sigma) foram utilizados para os ensaios de interação com a proteína GlnB marcada com $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e $^2\text{H}_2\text{O}$. O 2-oxoglutarato foi utilizado nas concentrações de 20, 40, 160, 400, 800, 1200 e 2000 μM . O ATP foi utilizado nas concentrações de 20 e 80 μM . Os dados de ressonância foram obtidos a 25°C em espectrômetros Bruker Avance de 600 MHz.

5.15 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA

Os experimentos de ressonância paramagnética foram realizados com 75 μM de proteína Fe ADP-ribosilada obtida com o complexo co-purificado DraT-GlnB, essencialmente como descrito por LANZILOTTA *et al.* (1996). Amostras em um estado de “repouso” (*resting state*) ou na presença de substrato N_2 e 50 μM de proteína MoFe (*turnover sample* de 30 segundos) foram monitoradas por EPR e comparadas com proteína Fe não modificada nas mesmas condições.

5.16 ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUXO INTERROMPIDO (*STOPPED-FLOW*)

A proteína Fe de *A. vinelandii* foi ADP-ribosilada com o complexo DraT-GlnB utilizando as condições do ensaio padrão. Para remover o complexo DraT-GlnB, a reação foi aplicada em uma coluna IMAC (2 mL) pré-equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 0,5 mM ADP. Para remover a interferência do ADP, a amostra de proteína Fe ADP-ribosilada contendo ADP foi lavada e concentrada em tampão na ausência de ADP em Amicon com membrana YM30.

A transferência de elétron da proteína Fe ADP-ribosilada para a proteína MoFe foi avaliada pelo monitoramento da absorvância em 430 nm. A mudança da absorvância em 430 nm é um indicativo da alteração do estado redox da proteína Fe devido a oxidação por um elétron de centro [4Fe-4S]. Esta mudança foi monitorada em um espectrofotômetro de fluxo parado Hi-Tech SF61 UV-Vis equipado com aquisição de dados e sistema de ajuste de curva. As reações foram realizadas a 25°C, de acordo com as condições pré-estabelecidas (DANYAL *et al.*, 2011).

5.17 ENSAIO DE ATIVIDADE DE DraG

A atividade de DraG foi avaliada utilizando como substrato a proteína Fe ADP-ribosilada obtida de acordo com o item 5.15. A reativação da atividade da nitrogenase foi mensurada pela utilização de um tampão contendo 50 mM Mops pH 7,5, 5 mM ADP ou ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 40 µg de DraG, ausência ou presença de diferentes proporções de GlnZ e AmtB que foi submetido ao processo de degaseificação. Ao tampão na ausência de oxigênio foram adicionados 100 µg de proteína Fe ADP-ribosilada na presença de ditionito, com volume final de 500 µL. A reação foi incubada por 20 min, 130 rpm a 30°C. Após este tempo, foi adicionado 500 µL de um tampão para atividade *in vitro* da nitrogenase contendo 200 mM MOPS pH 7,0, 13,4 mM MgCl₂, 60 mM fosfocreatina, 10 mM ATP, BSA 2,3 mg/mL, creatina fosfoquinase 0,4 mg/mL e 30 mM ditionito. Para avaliar a reativação da proteína Fe foram adicionados 500 µg de proteína MoFe e as amostras foram incubadas 16 min, 130 rpm a 30 °C e a atividade da nitrogenase foi parada com a adição de 300 µL EDTA 400 mM. A produção de H₂ foi quantificada por cromatografia gasosa em coluna Molecular Sieves 5A em cromatógrafo gasoso Varian 450.

5.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por teste t não pareado utilizando o programa Graph Pad Prism 5. Os valores de P menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PII

Proteínas PII tem sido purificadas a homogeneidade com a utilização de caudas de histidina, a fim de facilitar a purificação. Entretanto, a adição destas caudas pode afetar a função das proteínas PII, uma vez que a região C-terminal, por exemplo, contém o sítio de ligação a ATP (TRUAN *et al.*, 2010). A purificação de proteínas PII nativas foi reportada em cinco trabalhos e são necessárias várias etapas cromatográficas para se obter uma preparação homogênea (PORTUGAL *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2008; BONATTO *et al.*, 2007; VASUDEVAN *et al.*, 1994; SON e RHEE, 1987).

Resultados anteriores mostraram que GlnB e GlnZ de *A. brasilense* após incubação por 5 minutos a 95°C mantiveram o perfil de migração em gel nativo (INABA *et al.*, 2009) e foram capazes de interagir *in vitro* com AmtB (HUERGO *et al.*, 2006b), sugerindo manutenção da estrutura quaternária de proteínas PII a altas temperaturas. A adição de uma etapa de tratamento térmico antes da cromatografia foi reportada para a purificação de GlnB de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (65°C/5 min) (XU *et al.*, 2003) e GlnK de *E. coli* (80°C/4 min, banho de gelo/10 min) (RADCHENKO *et al.*, 2010). Entretanto, nenhum destes trabalhos descreveu o efeito desta etapa na homogeneidade, rendimento ou atividade da proteína. Além disso, o tempo descrito por estes autores pode não ser suficiente para atingir a temperatura reportada, pois foram necessários 10 min para atingir 65°C e 15 min para atingir 80°C no interior do tubos plásticos de polipropileno ou poliestireno contendo 20 mL da solução tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5.

Com a necessidade de obtenção de GlnB com alta pureza para realização deste trabalho, a primeira parte deste trabalho dedicou-se a explorar o uso de tratamento térmico para purificação de proteínas PII. Para isso, a proteína GlnB de *A. brasilense* recombinante foi expressa em *E. coli*, o extrato celular foi obtido por sonicação. A partir desta etapa, o extrato foi dividido em: (1) foi centrifugado, para obtenção da fração solúvel que foi submetida a cromatografia em coluna de heparina e (2) foi submetido a um tratamento térmico de 80°C por 15 min, seguido de banho de gelo por 15 min para posterior centrifugação para obtenção da fração solúvel e purificação em coluna de heparina.

Como pode ser observado nas Figuras 10 e 11, o tratamento térmico utilizado em (2) eliminou a maioria das proteínas contaminantes presentes no extrato celular.

As duas frações solúveis foram submetidas ao mesmo procedimento de purificação em coluna de heparina e eluídas com gradiente de KCl (Fig. 10). Após diálise, a pureza das amostras foi avaliada por SDS-PAGE (Fig. 11) e densitometria. A comparação entre as amostras de GlnB purificadas demonstrou que a homogeneidade aumentou de 70 para superior a 99%, enquanto que a quantidade de proteína recuperada foi menor com a etapa de tratamento térmico utilizada (Tabela 4). Para o tratamento térmico, as temperaturas de 60 e 70°C por 15 min também foram utilizadas. Em 60°C não houve significativo aumento da homogeneidade, de 70 para 85% (dados não mostrados), enquanto que a 70°C a homogeneidade foi de aproximadamente 95%, com aumento na quantidade de proteína em relação a GlnB obtida com aquecimento a 80°C (Tabela 4).

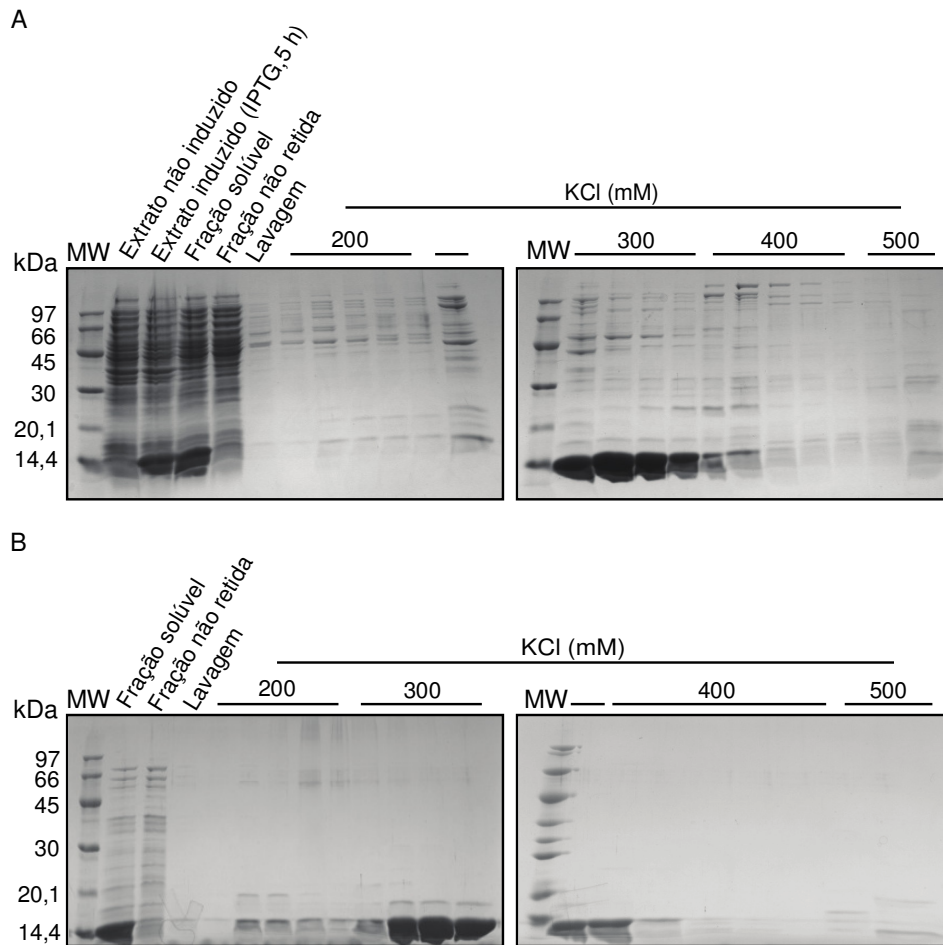


FIGURA 10 - PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *A. brasilense*
FONTE: A autora (2012).

NOTA: representativo da purificação da GlnB. A – purificação sem a etapa de aquecimento. Os extratos celulares não induzido (0 h) e induzidos por IPTG de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pLH25 para superexpressão da proteína (5 h) estão mostrados. B – purificação com a etapa de aquecimento de 80°C/15 min; banho de gelo/ 15 min antes da injeção na coluna de heparina. O extrato celular induzido foi utilizado para obtenção das frações solúveis. A fração solúvel foi aplicada na coluna cromatográfica. As proteínas que não ligaram na coluna durante a injeção estão mostradas na fração não retida. As proteínas foram eluídas com gradiente segmentado de KCl. As frações eluídas com 200, 300, 400 e 500 mM KCl estão mostradas. As frações com maior pureza foram reunidas e dialisadas em tampão Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl e 30% glicerol. Análise por SDS-PAGE (12%) e coloração com Coomassie Blue.

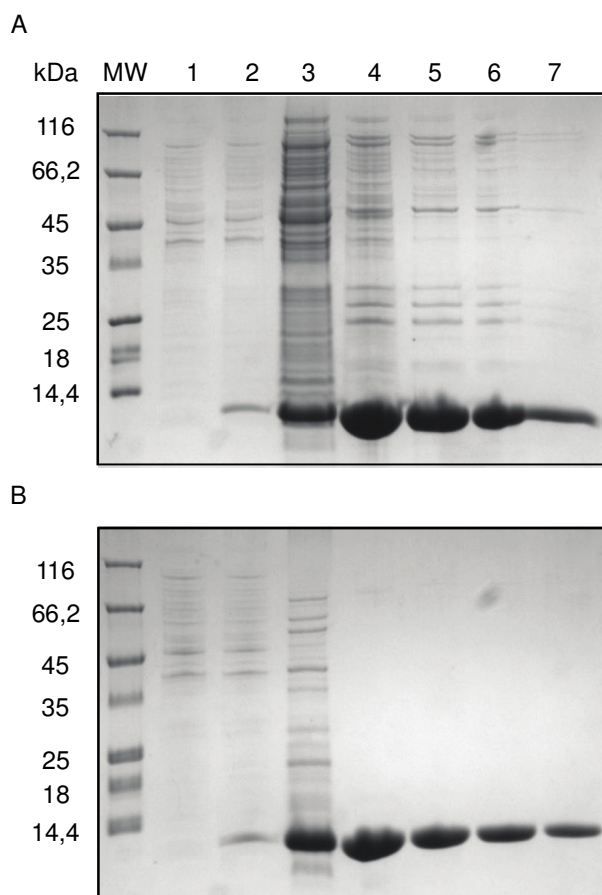


FIGURA 11 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA GlnB DE *A. brasilense* EXPRESSA EM *E. coli*

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A - Purificação sem etapa de tratamento térmico. B - Purificação com etapa de tratamento térmico 80°C/15 min e banho de gelo/15 min anterior a injeção com coluna de heparina. Análise por tricina-SDS-PAGE dos extratos celulares não induzido (linha 1) e induzidos por IPTG de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pLH25 para superexpressão da proteína (linha 2). A GlnB nativa foi purificada a partir das respectivas frações solúveis (linha 3) em coluna de heparina. Linhas 4-7 correspondem as frações de GlnB eluídas com 300 mM KCl e dialisadas em tampão contendo 100 mM KCl. O padrão de peso molecular (MW) está representado como kDa.

Resultados similares foram obtidos por Luíza Araújo para a purificação de GlnZ de *A. brasilense* (comunicação pessoal) e por Marco Aurélio de Oliveira para a purificação de GlnK de *E. coli* e *Herbaspirillum seropedicae* quando foi utilizada a etapa de tratamento térmico de 70°C por 15 min (MOURE *et al.*, 2012) e para GlnB de *Haloarcula marismortui* (dados não mostrados).

TABELA 4 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnB DE *Azospirillum brasilense*

Tratamento térmico	Extrato bruto (mg)	Fração solúvel (mg)	GlnB		
			Pureza (%) ^a	Proteína (mg) ^b	Rendimento (%) ^c
-	110	84	70	43	27
80°C/15 min	110	44	>99	31	28
70°C/15 min	122	36	95	39	30

^a A pureza foi determinada por análises densitométricas das amostras após cromatografia em géis SDS-PAGE e corados com Coomassie Blue.

^b A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford a partir das amostras purificadas.

^c O rendimento foi calculado como a porcentagem de proteína purificada em relação a quantidade total de proteína no extrato bruto.

6.2 ESTABILIDADE TÉRMICA DE PROTEÍNAS PII

A estabilidade térmica da proteína GlnB purificada com ou sem tratamento térmico foi avaliada pela determinação da temperatura de desnaturação (T_m) utilizando o corante fluorescente Sypro Orange (Invitrogen) (NIESEN *et al.*, 2007; EPPS *et al.*, 2001). O corante funciona como uma sonda que se liga nas regiões hidrofóbicas das proteínas, expostas durante o desenovelamento, de forma que a fluorescência aumenta com o aumento do desenovelamento dado o aumento da temperatura (NIESEN *et al.*, 2007). Assim, a T_m , que é a temperatura na qual as concentrações da proteína enovelada e desenovelada são iguais, é quando a fluorescência emitida tem a metade do seu valor máximo. Para facilitar a determinação de T_m , um gráfico de primeira derivada da fluorescência do repórter pode ser gerado pelo programa de análise de dados do equipamento de RT-PCR e a T_m é o ponto máximo desta curva (NIESEN *et al.*, 2007). A Figura 12 mostra o resultado da determinação da T_m para GlnB, com valor de 84°C (Tabela 5), para ambas preparações: as obtidas com e sem o tratamento térmico. Como controle deste método, a T_m da lisozima de clara de ovo foi determinada. O resultado foi o valor T_m de 74°C (Fig. 12), similar ao valor previamente reportado pelo monitoramento da absorbância a 292 nm (SHIH *et al.*, 1995).

Para validar esta elevada estabilidade térmica para outras proteínas PII, as proteínas GlnZ de *A. brasilense* (gentilmente cedida por Luíza Araújo), GlnB e GlnK de *H. seropedicae* e GlnK de *E. coli* (gentilmente cedidas por Marco Aurélio de Oliveira), foram utilizadas para determinação da T_m utilizando Sypro Orange. Assim como para GlnB de *A. brasilense*, as outras proteínas PII também apresentaram altos valores de

T_m (Tabela 5). O valor médio de T_m para as 5 proteínas PII utilizadas representantes das classes α , β e γ de Proteobactérias foi de 77°C e o menor valor obtido foi para a GlnK de *E. coli* (66°C). Este resultado associado a alta similaridade entre diferentes proteínas PII sugere fortemente que a alta estabilidade térmica seja universal para proteínas PII de Proteobactérias.

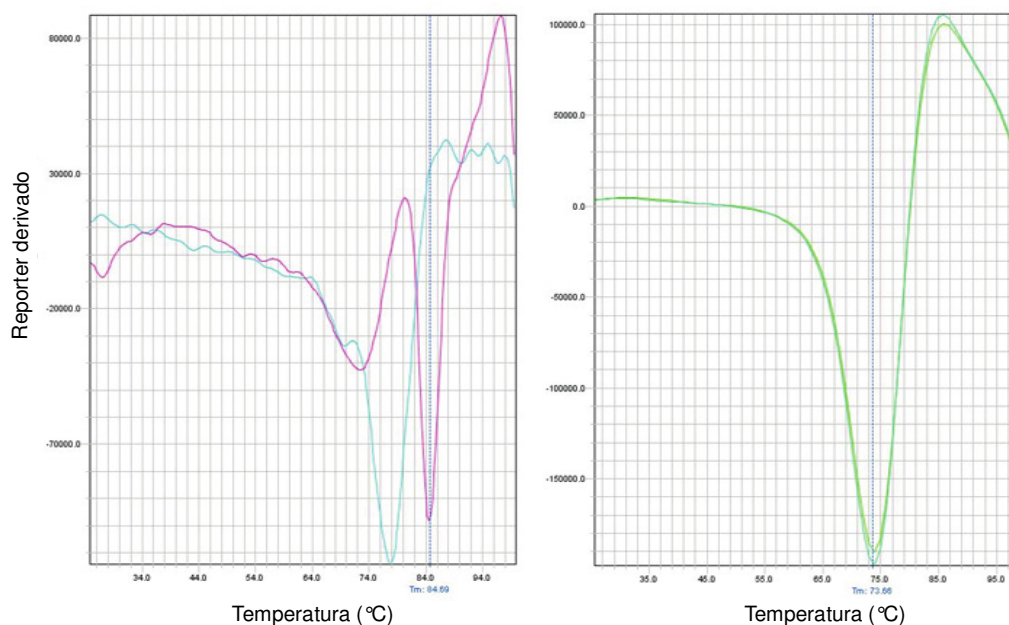


FIGURA 12 - DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO UTILIZANDO SYPRO ORANGE

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Os perfis de fluorescência emitida do corante Sypro Orange na presença das proteínas PII (A), onde GlnB de *A. brasilense* está representada em rosa, GlnB de *H. seropedicae* em azul e lisozima de clara de ovo (B) representada em verde.

TABELA 5 - VALORES DE TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO DE PROTEÍNAS PII DETERMINADOS UTILIZANDO SYPRO ORANGE

PII	T_m (°C)
GlnB de <i>A. brasilense</i>	84
GlnZ de <i>A. brasilense</i>	80
GlnB de <i>H. seropedicae</i>	78
GlnK de <i>H. seropedicae</i>	76
GlnK de <i>E. coli</i>	66

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Sypro Orange foi diluído para 5x em tampão Tris-HCl pH 7,5 contendo 100 mM KCl e 10 μ M de cada trímero de proteína PII utilizada. As temperaturas de melting foram determinadas pelo máximo valor da curva de primeira derivada dos dados de fluorescência emitidos. A média dos valores de T_m está apresentada e os desvios padrões calculados foram menores do que 1%.

O fato das proteínas PII serem triméricas complica a interpretação dos valores de T_m . Para determinar se o T_m reflete a dissociação do trímero em monômeros, desenovelamento dos monômeros ou uma mistura de ambos, um experimento baseado na capacidade das PII formarem heterotrímeros foi realizado (FORCHHAMMER *et al.*, 1999). Para este ensaio, foram misturados trímeros de GlnZ uridilados e não uridilados e a formação de heterotrímeros foi avaliada após incubação em diferentes temperaturas por eletroforese nativa (Fig. 13). A GlnB de *A. brasilense* não foi analisada uma vez não há formação de trímeros parcialmente uridilados *in vivo* (HUERGO *et al.*, 2006b) ou *in vitro* (INABA *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2008).

A proteína GlnZ não modificada apresentou uma única banda homogênea de migração e a GlnZ uridilada apresentou duas bandas de migração, correspondentes a $\text{GlnZ}-(\text{UMP})_3$ e $\text{GlnZ}(\text{UMP})_2$ com 71 e 29%, respectivamente, como analisada por densitometria das bandas. A mistura de quantidades iguais da GlnZ não modificada e uridilada seguida de incubação por 5 min a temperaturas de 40 a 80°C. O perfil de migração não foi modificado até a temperatura de 50°C. Entretanto, a incubação em 60, 70 e 80°C causou o aparecimento das novas estruturas triméricas $\text{GlnZ}(\text{UMP})_1$ e $\text{GlnZ}(\text{UMP})_2$ (Fig. 13). A 70°C houve a dissociação completa do trímero de GlnZ. Este resultado sugere que o valor de T_m de 80°C reflete o desenovelamento do monômero. Portanto, pode-se afirmar que o tratamento térmico utilizado para a purificação de proteínas PII rompe a sua estrutura quaternária que é reestabelecida durante o resfriamento (INABA *et al.*, 2009).

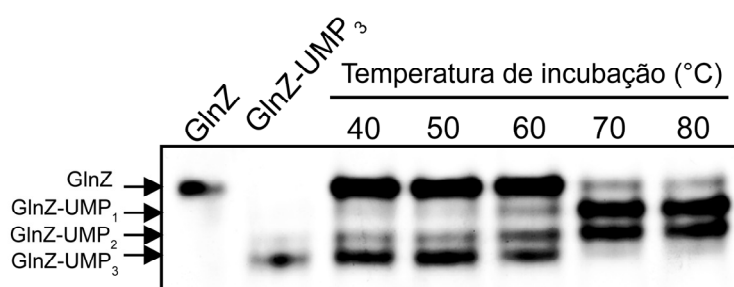


FIGURA 13 - FORMAÇÃO DE HETEROTRÍMEROS ENTRE GlnZ E GlnZ-UMP₃ EM DIFERENTES TEMPERATURAS

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: As proteínas GlnZ não modificada e uridilada foram misturadas com a razão 1:1 e incubadas durante 5 min nas temperaturas indicadas. As amostras foram posteriormente incubadas em banho de gelo por 5 min antes da análise. GlnZ e GlnZ(UMP)₃ estão mostradas como controles. Análise por eletroforese nativa (7,5%) e coloração com Coomassie Blue.

6.3 ESTUDO CONFORMACIONAL DA PROTEÍNA GlnB NATIVA DE *A. brasilense* POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os resultados apresentados sugere que o tratamento térmico de 80°C melhora significativamente a homogeneidade da GlnB após apenas uma etapa cromatográfica, devido a alta estabilidade térmica das proteínas PII.

Para avaliar se o tratamento térmico afeta a conformação da proteína GlnB foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para esta análise, a proteína foi expressa em *E. coli* BL21 contendo plasmídeo pLH25 em meio mínimo. A condição de indução estabelecida para expressão da GlnB com IPTG (0,4 mM) foi de 16 h a 37°C (Fig. 14). Confirmada a expressão em meio mínimo, a próxima etapa foi cultivada *E. coli* BL21 (DE3) em meio mínimo contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e D_2O até uma D.O._{600} de 0,7 para a indução com 0,4 mM de IPTG aproximadamente 18 h a 37°C em um volume de 500 mL. Confirmada a expressão em meio mínimo contendo os isótopos pesados de N e H, a amostra foi dividida igualmente para ser submetida aos dois processos de purificação.

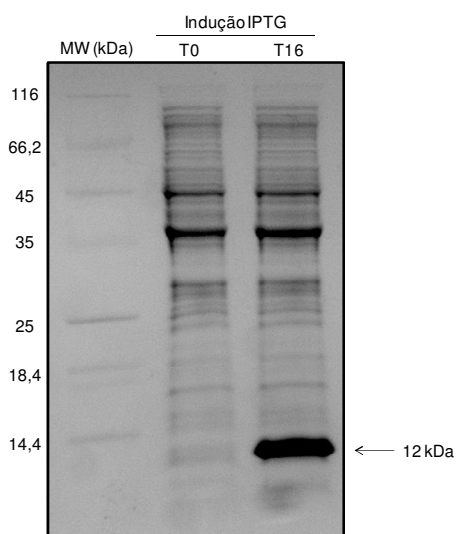


FIGURA 14 - CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnB NATIVA DE *A. brasilense* EM MEIO MÍNIMO NÃO MARCADO
 FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (18%). Os tempos de indução com IPTG estão representados como 0 e 16 h, 37°C. A flecha indica a massa molecular da proteína, equivalente ao monômero, de 12 kDa. O gel foi corado em Coomassie Blue.

A marcação com $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ permite a análise por RMN 2D, correlacionando a frequência de deslocamento do ^{15}N com ^1H . A utilização do deutério para expressão da proteína é necessária para aumentar a relação sinal/ruído, o que é de especial

importância para proteínas consideradas grandes para a técnica de RMN (>30 kDa) (SATTLER e FESIK, 1996).

6.3.1 Efeito do tratamento térmico na GlnB no processo de purificação

Para avaliar a influência no enovelamento protéico quando a amostra é submetida ao processo de tratamento térmico previamente à purificação, foram estabelecidos dois protocolos de purificação a partir da expressão de GlnB em meio mínimo duplamente marcado. 1 - A amostra foi sonicada e a fração solúvel (FSa) foi submetida à purificação em coluna de heparina com gradiente de KCl. 2 - A amostra foi sonicada e a fração solúvel foi submetida a um processo de desnaturação térmica a 80°C por 15 min com posterior incubação em gelo por 15 min. Após centrifugação, foi obtida a fração solúvel, denominada FSb, a qual foi submetida à purificação em coluna de heparina com gradiente de KCl.

Pela Figura 15 é possível perceber que o tratamento térmico resulta em uma fração solúvel (FSb) com maior homogeneidade do que visualizado para FSa. Entretanto, após a purificação em coluna de heparina, a homogeneidade das amostras é semelhante. Esta diferença é imperceptível na expressão em meio mínimo marcado, mas estes mesmos processos de purificação foram realizados com a GlnB expressa em meio não marcado foi possível notar uma homogeneidade de aproximadamente 70% com a presença de alguns contaminantes apenas para a purificação 1 (Figura 11 e Tabela 4). Com isso, é possível concluir que a pureza da GlnB purificada marcada foi a mesma para ambos protocolos de purificação. Esse resultado pode ser justificado porque na presença de, principalmente, deutério existe uma menor expressão de proteínas de *E. coli*, o que diminui a presença de contaminantes (HOCHULI *et al.*, 2000).

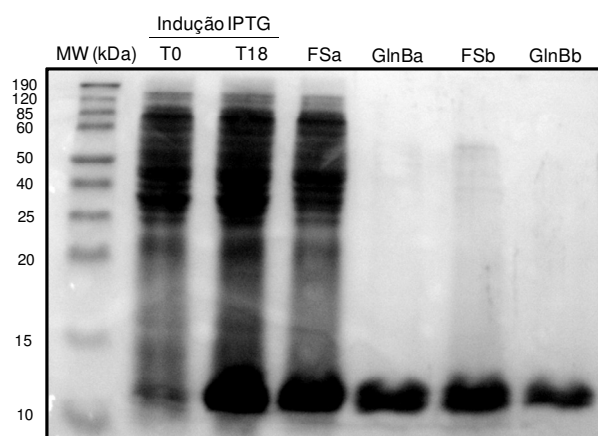


FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS EXTRATOS PROTÉICOS DE *E. coli* BL21(DE3) EXPRESSANDO A PROTEÍNA GlnB NATIVA (^{15}N , ^2H) DE *A. brasilense*
 FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (18%) das frações no tempo 0 e 18 de indução com IPTG a 37°C , das frações solúveis das frações purificadas de GlnB submetidas aos protocolos de purificação a e b. Onde, a representa a purificação sem tratamento térmico e b representa a purificação posterior ao tratamento térmico. Os marcadores de massa molecular estão indicados como MW em kDa. O gel foi corado em Coomassie Blue.

6.3.2 Efeito da temperatura na conformação global de GlnB de *Azospirillum brasilense*

A utilidade de ^1H RMN na caracterização de alterações estruturais causadas pela aumento da temperatura já foi demonstrada (XIA *et al.*, 2005). Dada a alta homogeneidade da GlnB (^{15}N , ^2H) obtida sem a etapa de tratamento térmico e considerando que o rendimento desta preparação foi aproximadamente 2 vezes maior, esta foi a preparação definida para as análises ^1H RMN realizadas em diferentes temperaturas (Fig. 16). Nenhuma alteração conformacional relevante foi detectada pelo aumento da temperatura até 70°C (a máxima temperatura utilizada). Os grupos CH aromáticos e alifáticos mantiveram a mesma conformação com o aumento da temperatura (entre 0,5 e 2,5 ppm). As mais altas temperaturas resultaram em trocas conformacionais NH da cadeia principal, representadas pelo alargamento dos sinais na região espectral de 6,5 a 9,0 ppm (Fig. 16). Esta característica foi confirmada quando a mesma amostra de GlnB foi submetida ao resfriamento a 25°C . O espectro denominado 25°C -retorno (Fig. 16) corresponde ao espectro inicial na mesma temperatura, anterior ao aumento de temperatura (comparação entre os espectros 25°C e 25°C -retorno). A partir destes resultados, pode-se concluir que a GlnB de *A. brasilense* manteve sua conformação global a uma temperatura até 70°C e que o tratamento térmico utilizado para a purificação de PII não causa em desnaturação e renaturação da proteína.

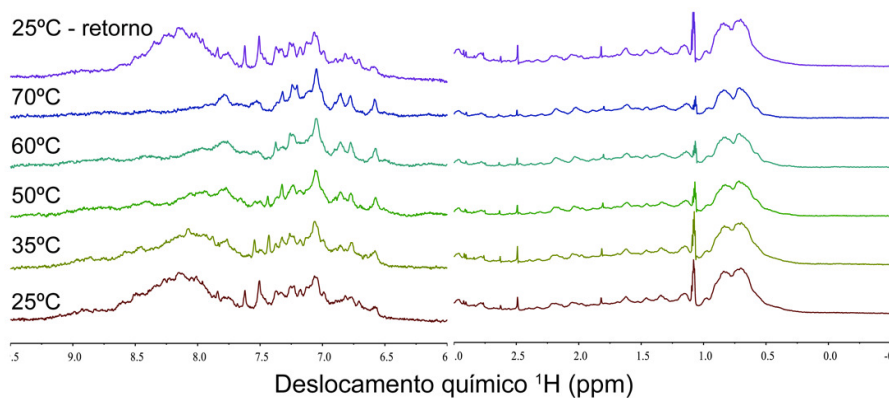


FIGURA 16 - ESPECTROS ^1H DA GlnB DE *A. brasilense* MARCADA (^{15}N , ^2H) OBTIDOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Os experimentos foram realizados de forma sequencial com a mesma amostra protéica a 25, 35, 50, 60, 70°C e seguido para resfriamento a 25°C (25°C- retorno).

6.3.3 Efeito do tratamento térmico para purificação de proteínas PII na conformação da GlnB

Para assegurar que a estrutura da GlnB de *A. brasilense* não é afetada pela adição da etapa de tratamento térmico durante a purificação de proteínas PII, espectros de ^1H - ^{15}N TROSY da GlnB purificada com e sem a etapa de aquecimento (80°C/15 min) foram comparados (Fig. 17).

TROSY (*Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*) é baseado nos acoplamentos J e é utilizado para correlacionar o N do grupo amida com o próton ligado a ele, com uma resolução dos sinais muito maior do que quando é utilizada somente a correlação heteronuclear (VENTERS *et al.*, 2002). Assim, no espectro obtido, é possível identificar cada sinal como cada resíduo de aminoácido presente na proteína. A Figura 17 mostra que ambas preparações de GlnB obtidas com e sem a etapa de tratamento térmico possuem a mesma conformação global. Aproximadamente 100 sinais podem ser distinguidos na Figura 17A, cada um correspondendo a cada resíduo de aminoácido da proteína (112 no total, mas as duas prolinas presentes não podem ser visualizadas neste experimento). Os sinais ^{15}N - ^1H amídicos estão bem dispersos entre 6,8 e 9,7 ppm na dimensão do próton e 108 e 130 ppm na dimensão do nitrogênio. Os sinais com maior alargamento de linha podem ser correlacionados com as regiões de voltas da GlnB, mais provavelmente relacionados com a volta T, por estarem em troca conformacional em proteínas PII (TRUAN *et al.*, 2010).

Com a sobreposição dos espectros das amostras de GlnB obtidas com e sem a etapa de tratamento térmico (Fig. 17B), foi possível confirmar que a conformação de GlnB não é afetada pelo aquecimento a 80°C e posterior resfriamento.

Com estes resultados, o protocolo para purificação de proteínas PII foi desenvolvido com a utilização de uma etapa de tratamento térmico (70°C/15 min) anterior a injeção cromatográfica. Este tratamento aumentou a homogeneidade das preparações (de 70 para 99%), aumentou a quantidade de proteína purificada obtida (30 para 37 mg, considerando a homogeneidade) (Tabela 4) e foi provado por experimentos de RMN não afetar a conformação global da GlnB de *A. brasilense*.

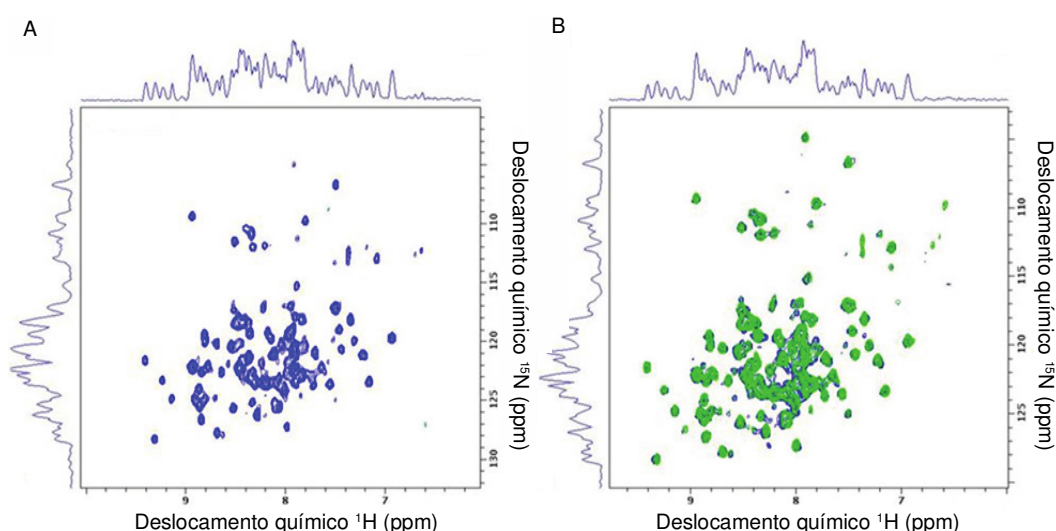


FIGURA 17 - ESPECTRO ^1H - ^{15}N TROSY DA PROTEÍNA GlnB NATIVA DE *A. brasilense* MARCADA (^{15}N , ^2H)
 FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Análise em Bruker Avance 600 MHz, pH 7,5, 25°C. A - Espectro da GlnB submetida ao protocolo de purificação sem tratamento térmico. B - Sobreposição dos espectros de GlnB (azul, A) e GlnB submetida a etapa de tratamento térmico de 80°C, 15 min durante purificação (verde).

6.4 INTERAÇÃO DOS EFETORES 2-OXOGLUTARATO E ATP COM GlnB

Além da capacidade das proteínas PII sofrerem modificação covalente pela proteína GlnD em resposta ao níveis de amônio, eles também são capazes de interagir com sinalizadores dos níveis de carbono, o 2-oxoglutarato, e dos níveis de energia, ATP e ADP (FORCHHAMMER, 2008). Esta ligação com moléculas efetoras modifica a interação com outras proteínas, como DraT e DraG, de maior relevância para este trabalho (HUERGO *et al.*, 2012a; HUERGO *et al.*, 2009).

Sabendo desta ligação de PII com efetores, o 2-oxoglutarato (2-OG) e o ATP foram titulados, separadamente, com a proteína GlnB, na concentração de 100 μM considerando o monômero (Fig. 18 e 19, respectivamente). O 2-oxoglutarato foi utilizado nas concentrações de 20, 40, 160, 400, 800, 1200 e 2000 μM , o que equivale a razões de proteína/ligante de 5, 2,5, 0,625, 0,25, 0,125, 0,083 e 0,05. O ATP foi utilizado nas concentrações de 20 e 80 μM , o que equivale a razões de proteína/ligante de 5 e 1,25. O que se esperava obter neste experimentos foi o deslocamento químico crescente de alguns sinais com o aumento da concentração dos titulante. Tais sinais estariam relacionados a resíduos de aminoácidos que interagem com o efetor.

Como as análises ainda são preliminares, ainda não foi possível identificar os sinais que se deslocam progressivamente com o aumento da concentração 2-OG, mas foi possível observar diferenças em relação à ausência e presença de 2-OG, sendo mais evidente na maior concentração utilizada (2 mM). Os espectros das outras concentrações de 2-OG foram obtidos, mas não estão mostrados. Duas regiões do espectro de sobreposição entre a GlnB na ausência e presença do efetor foram ampliadas para melhor visualização dos detalhes. O que pode ser observado são os deslocamentos do centro do pico, o aparecimento de alguns sinais e o aumento da largura de linha de alguns sinais que pode indicar trocas entre grupos. Estas características, em conjunto, indicam a interação com o efetor, mas análises posteriores devem ser feitas para que conclusões a respeito do sítio de ligação, constante de afinidade e trocas conformacionais sejam obtidas.

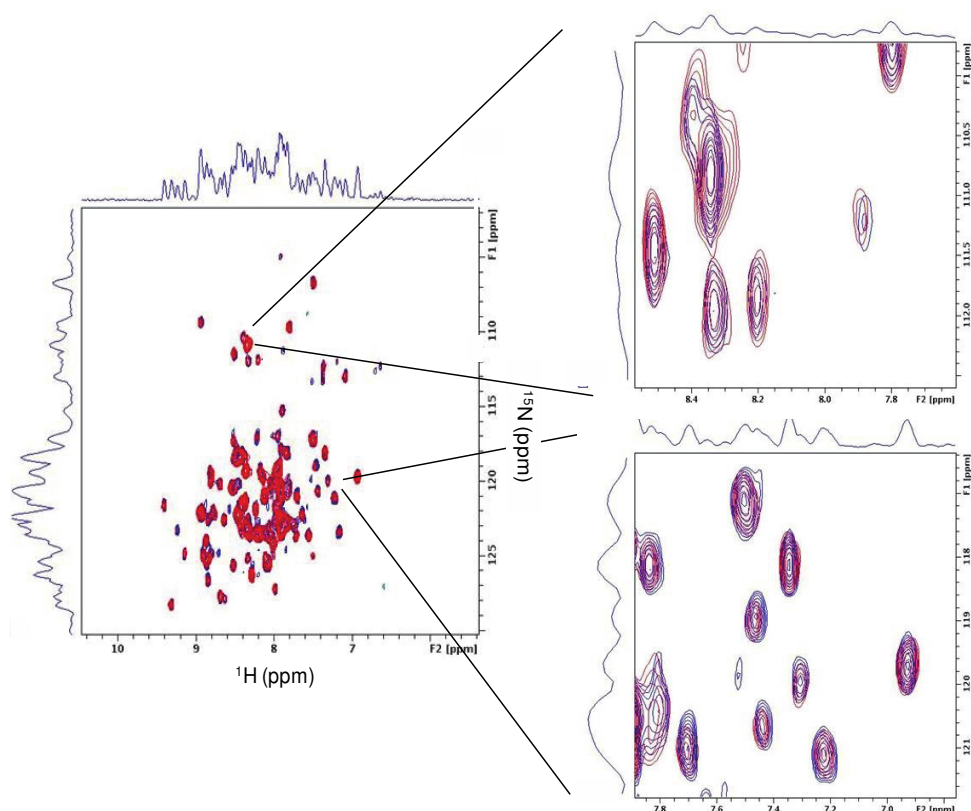


FIGURA 18 - ESPECTRO ^1H - ^{15}N TROSY DA PROTEÍNA GlnB MARCADA (^{15}N , ^2H) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE 2-OXOGLUTARATO
 FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Espectros na ausência (azul) e na presença de 2 mM de 2-oxoglutarato (vermelho). Análise em Bruker Avance 600 MHz, pH 7,5, 25°C. As linhas representam a região ao espectro ampliada para visualização dos detalhes.

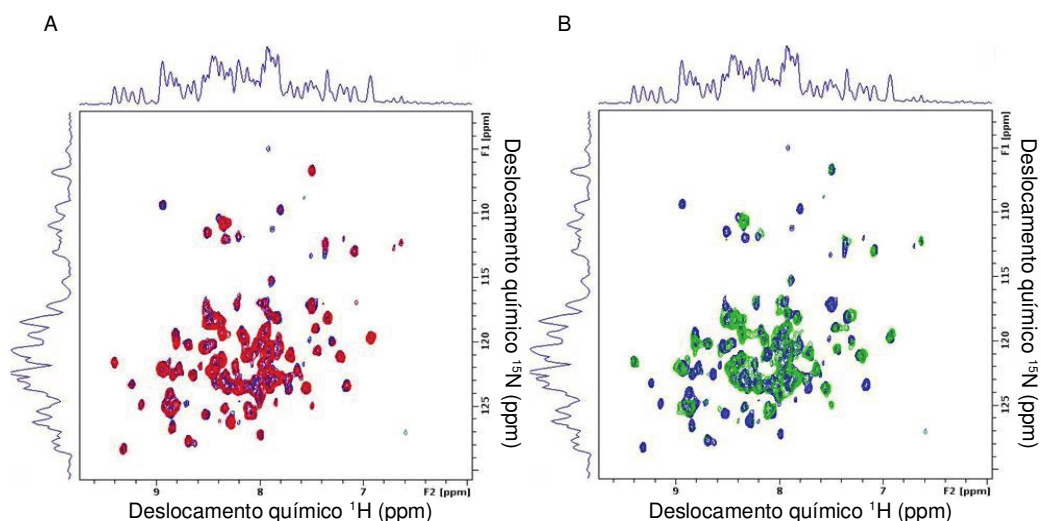


FIGURA 19 - ESPECTRO ^1H - ^{15}N TROSY DA PROTEÍNA GlnB MARCADA (^{15}N , ^2H) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ATP.

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A - Espectros na ausência (azul) e na presença de 20 μM de ATP (vermelho). B – Espectros na ausência (azul) e na presença de 80 μM de ATP (verde). Análise em Bruker Avance 600 MHz, pH 7,5, 25°C.

Na presença de 20 μM de ATP as diferenças em relação aos sinais de correlação da proteína GlnB foram pouco evidentes (Fig. 19A). A próxima concentração avaliada de ATP foi de 80 μM (Fig. 19B), mas nesta concentração foi observada perda de sinal de ressonância causada pela precipitação de proteína, por provável desnaturação. Assim, não foi possível realizar uma comparação adequada da sobreposição dos espectros na ausência e presença de ATP nesta concentração. Esta precipitação de proteínas PII na presença de ATP não é comum (Inaba, 2009; JIANG e NINFA, 2007). Uma das causas desta precipitação pode ter sido o sal de ATP utilizado para fazer a solução do titulante. A presença de sódio, ATP como sal dissódico, pode ter ocasionado a precipitação protéica, de acordo com o que já foi observado por Huergo (comunicação pessoal). Aparentemente, não foi a concentração de proteína utilizada, pois Inaba (2009) utilizou até 130 μM de proteína considerando o trímero e não foi observada precipitação protéica.

Para posteriores análises do sítio de ligação, deve primeiro ser definido um protocolo para titulação deste efetor, também na presença de MgCl_2 . Foram realizados alguns testes preliminares utilizando os efetores ATP (na presença e ausência de MgCl_2), 2-OG e ADP. Como amostra protéica foi utilizada GlnB expressa em meio mínimo não marcado, purificada em coluna de heparina com gradiente de KCl. Esta

amostra de GlnB de 89 μ M considerando o monômero foi utilizada para a triagem de concentração de efetores (dados não mostrados). Houve precipitação da proteína em concentrações de ATP a partir de 20 mM, solução estoque preparada com água milli-Q ou o tampão da proteína (observação visual). A presença de $MgCl_2$ aumentou a precipitação em relação a ausência nas amostras com ATP. Assim, a causa da precipitação da proteína nos experimentos de RMN na presença de ATP permanece desconhecida.

6.5 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DO SISTEMA DraT/DraG *in vivo* EM *A. brasilense*

A regulação por ADP-ribosilação da nitrogenase é resultado da regulação das atividades de DraT e DraG, como mostrado na Figura 7. Em condições de fixação de nitrogênio, DraT está inativa, com o aparecimento de apenas 1 banda correspondente a proteína Fe ativa. DraG é ativa nestas condições e é inativada por um estímulo negativo, como o cloreto de amônio (Fig. 20), sendo novamente ativada quando este estímulo negativo é removido, causando ativação da nitrogenase (ZHANG *et al.*, 1997). Na estirpe mutante *draG* de *A. brasilense* (UB4) existe a presença de duas bandas correspondentes a proteína Fe e proteína Fe ADP-ribosilada, mesmo em condições de fixação de nitrogênio, dada a presença de DraT funcional. No mutante *draT* de *A. brasilense* (UB2), a proteína Fe está ativa mesmo em choque de amônio, mostrando que mesmo com a inativação de DraG, a proteína Fe não é modificada pela ausência de DraT (Fig. 20). Com este resultado, podemos afirmar que as proteínas DraT e DraG de *A. brasilense* estão respondendo *in vivo* como o esperado frente a regulação por amônio na modificação pós-traducional da proteína Fe.

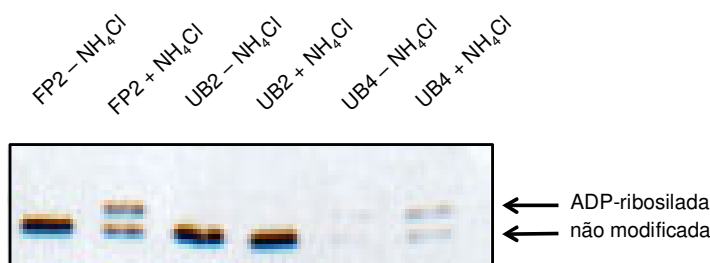


FIGURA 20 - ADP-RIBOSILAÇÃO DA PROTEÍNA Fe DEPENDENTE DE AMÔNIO EM ESTIRPES DE *A. brasilense*

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Cloreto de amônio (1 mM) foi adicionado a culturas de nitrogenase desreprimadas das estirpes indicadas. Depois de 5 minutos, as formas ADP-ribosiladas e não modificadas da proteína Fe foram identificadas por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%, *low cross linker* 172:1 acrilamida:bisacrilamida) seguido por Western blot utilizando anticorpo anti-NifH.

6.6 ATIVAÇÃO DA DraT PELA PROTEÍNA GlnB de *A. brasilense*

A partir dos resultados reportados para primeira DraT purificada de *R. rubrum* surgiu a especulação sobre a regulação de DraT por proteínas PII. A preparação continha uma banda contaminante observada por SDS-PAGE com aproximadamente 12 kDa e houve diminuição da atividade de DraT na tentativa de remoção deste contaminante (LOWERY e LUDDEN, 1988). Anos mais tarde, vários trabalhos demonstraram a importância de proteínas PII na regulação do sistema DraT/DraG (HUERGO *et al.*, 2012a, b). A interação de DraT com GlnB já foi demonstrada por ensaios de co-precipitação *in vivo* (HUERGO *et al.*, 2006a) e *in vitro* (HUERGO *et al.*, 2009) em *A. brasilense* e por sistemas de duplo híbrido em *R. rubrum* (ZHU *et al.*, 2006) e em *R. capsulatus* (PAWLOWSKI *et al.*, 2003). A formação do complexo DraT-GlnB é regulada pelo *status* de nitrogênio *in vivo* (HUERGO *et al.*, 2006a). Em condições de fixação de nitrogênio, DraT está inativa. Por outro lado, após choque de amônio, GlnB na sua forma não uridililada liga-se a DraT (HUERGO *et al.*, 2009), condição na qual DraT deve estar ativa para catalisar a ADP-ribosilação da proteína Fe, inativando, assim, a nitrogenase. Apesar da interação de DraT e GlnB já ter sido mostrada, o controle da atividade de DraT por GlnB ainda permanece desconhecido.

A DraT é específica para a modificação da proteína Fe na sua forma completamente ativa, ou seja, com seus centros [4Fe-4S] intactos, embora não reconheça somente o substrato do seu hospedeiro (LUDDEN, 1994; LOWERY e LUDDEN, 1988). DraT de *R. rubrum* foi capaz de ADP-ribosilar a proteína de outras bactérias além de *R. rubrum*, incluindo *A. vinelandii*, *K. pneumoniae* e *Clostridium pasteurianum* (ZHANG *et al.*, 2001b; ZHANG *et al.*, 1995; LOWERY e LUDDEN, 1988). Estes resultados sugerem que a regulação do *switch-on/off* da nitrogenase pode ser semelhante nos organismos que apresentam o sistema DraT/DraG.

Neste trabalho, a atividade de DraT foi determinada indiretamente através da atividade da nitrogenase *in vitro*, utilizando proteína Fe e MoFe de *A. vinelandii* (Fig. 21) e NAD⁺ como doador de grupo ADP-ribosil (PONNURAJ *et al.*, 2005; GRUNWALD *et al.*, 2000; GRUNWALD *et al.*, 1995; LOWERY e LUDDEN, 1988; LOWERY *et al.*, 1986). A DraT utilizada continha uma cauda de histidina e esta variante apresentou atividades comparáveis a proteína nativa *in vivo* (HUERGO *et al.*, 2006b). A nitrogenase de *A. vinelandii* é a melhor estruturalmente caracterizada e a sua proteína Fe apresenta 74% de identidade com a de *A. brasilense*. Em *A. vinelandii* o resíduo de arginina tem a posição 100, mantendo a mesma posição espacial do resíduo de arginina 101 em *A. brasilense* (LI *et al.*, 2009; LUDDEN, 1994).

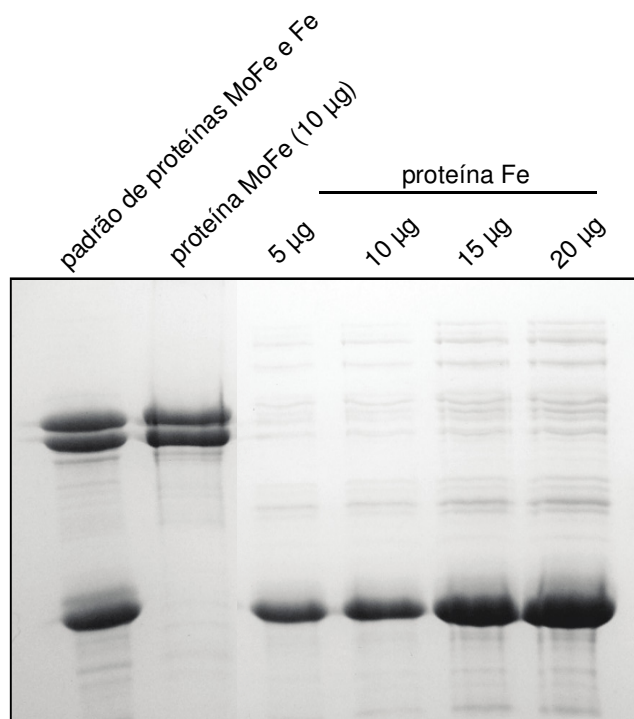


FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS MOFE E FE DE *A. vinelandii*

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Estão mostradas as preparações de proteínas MoFe e Fe purificadas utilizadas neste trabalho. O padrão de proteínas da nitrogenase foi feito com mistura equimolar de proteína MoFe e Fe purificadas separadamente, e 10 µg de proteína foram utilizados. A proteína MoFe com cauda de histidina foi obtida a partir da expressão na estirpe DJ995 de *A. vinelandii*. A proteína Fe foi obtida na sua forma nativa a partir da expressão na estirpe DJ884 *A. vinelandii*. Análise por SDS-PAGE (12%) e coloração com Coomassie Blue.

Para avaliar se GlnB regula a atividade de DraT de *A. brasilense*, inicialmente, o complexo DraT-GlnB foi formado por reconstituição *in vitro* com diferentes razões molares DraT-GlnB na presença de ADP. A proteína GlnB foi purificada com etapa de tratamento térmico e a His-DraT foi purificada por cromatografia de afinidade (Fig. 22). Após prévia incubação da proteína Fe com as proteínas DraT e GlnB, a proteína MoFe foi adicionada e o H₂ produzido pelo complexo da nitrogenase foi quantificado. Como controle foi utilizado o complexo DraT-GlnB co-expresso e co-purificado na razão molar 1:1 (DraT:GlnB) após cromatografia de exclusão molecular (Fig. 23) na presença e ausência de NAD⁺ (Fig. 24). O DraT-GlnB co-expresso e co-purificado na razão molar 1:1 apresentou maior atividade em relação as frações de maior peso molecular que também continham bandas correspondentes a HisDraT e GlnB (Fig. 23B). Na ausência de NAD⁺, a proteína Fe estava completamente ativa, com produção de H₂ maior do que 2300 nmol min⁻¹ mg proteína Fe⁻¹ (SEEFELDT *et al.*, 1992). Nas

condições de ensaio utilizadas, a DraT sozinha não foi capaz de inibir a atividade da nitrogenase. O complexo DraT-GlnB co-purificado na presença de NAD⁺ inibiu completamente a atividade da nitrogenase. O aumento da proporção de GlnB no complexo DraT-GlnB formado *in vitro* diminuiu a atividade da nitrogenase e esta diminuição foi mais significativa no complexo formado *in vitro* DraT-GlnB 1:2 (Fig. 24A, 37% de inibição). A utilização de proporções maiores DraT:GlnB 1:4 e 1:8 não aumentou a inibição da atividade da nitrogenase, o que pode ser justificado pela formação de agregados, os quais foram menos ativos do que o complexo 1:1 co-purificado (dados não mostrados).

O complexo DraT-GlnB foi capaz de ADP-ribosilar uma das subunidades do homodímero da proteína Fe utilizando NAD⁺ (Fig. 24B). A subunidade modificada (superior) e a não modificada (inferior) podem ser observadas com uma razão aproximada de 1:1 (42 e 58%, respectivamente). Portanto, a ADP-ribosilação dependente de NAD⁺ catalisada pelo complexo DraT-GlnB causou a inibição da atividade da nitrogenase (Fig. 24).

Como pode ser observado Figura 24A, a eficiência da ADP-ribosilação na proteína Fe catalisada pelo complexo DraT-GlnB co-purificado foi aproximadamente três vezes maior do que o complexo formado *in vitro* na razão molar 1:2 DraT:GlnB (260 nmol de Fe proteína min⁻¹ mg DraT⁻¹ comparado a 97 nmol min⁻¹ mg DraT⁻¹). Esta diferença pode ser explicada pela não completa interação *in vitro* entre DraT e GlnB e justifica a utilização do complexo co-purificado na razão molar 1:1 DraT: GlnB como controle positivo da reação de ADP-ribosilação (HUERGO *et al.*, 2009).

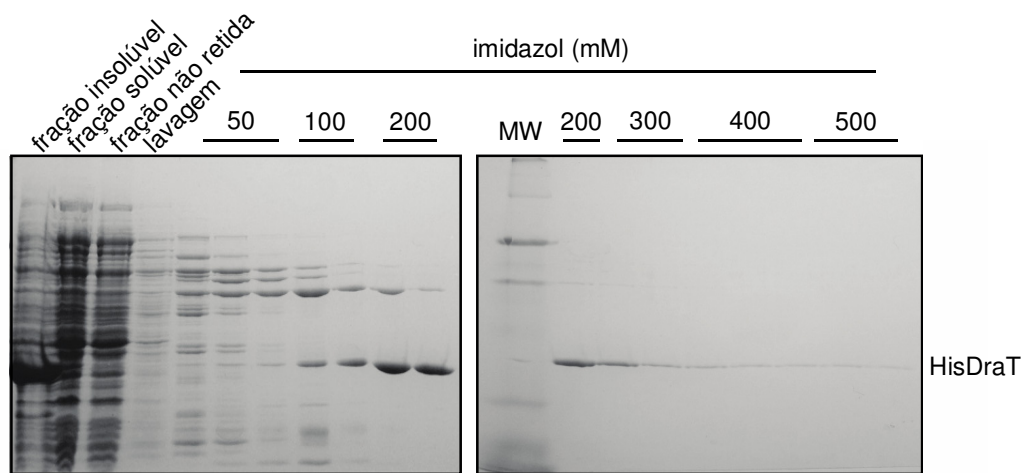


FIGURA 22 - PERFIL REPRESENTATIVO DA PURIFICAÇÃO DE DraT DE *A. brasilense*

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Estão mostradas as frações insolúvel e solúvel obtidas após rompimento celular por sonicação e centrifugação. A DraT foi purificada a partir da fração solúvel em coluna de afinidade HiTrap Chelating. A fração não retida corresponde a fração de proteína que não ligou na coluna durante a injeção da amostra e a lavagem corresponde a fração que não permaneceu ligada a coluna durante a etapa de lavagem. A proteína DraT com cauda de histidina foi eluída com gradiente segmentado de imidazol. As frações purificadas apresentaram um banda com aproximadamente 32 kDa, correspondente a proteína HisDraT. Análise por SDS-PAGE (12%) e coloração com Coomassie Blue.

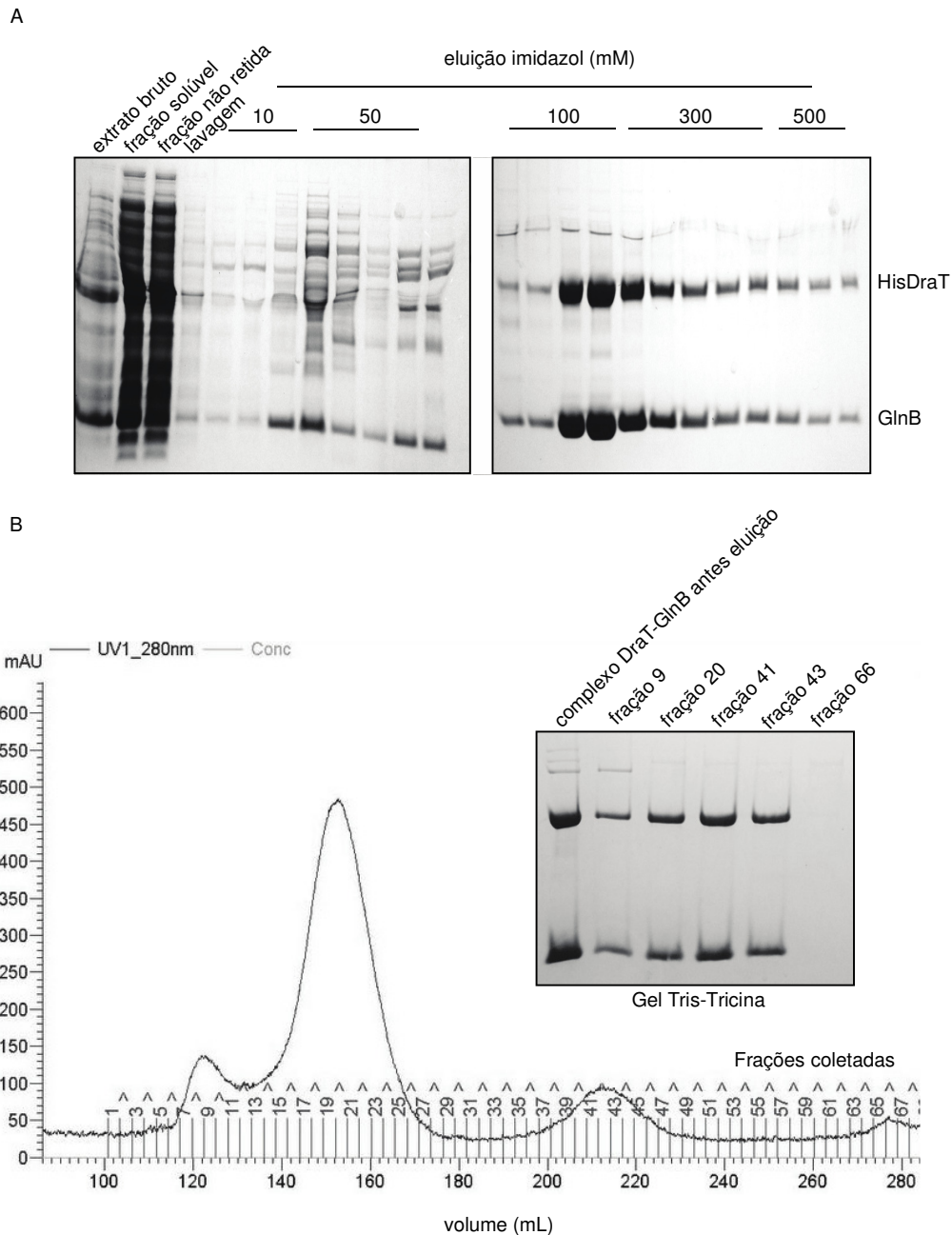


FIGURA 23 - PERFIL REPRESENTATIVO DA CO-PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO HisDraT-GlnB DE *A. brasilense*

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A – Perfil eletroforético (Tricina-SDS-PAGE) representativo da co-purificação do complexo HisDraT-GlnB em coluna IMAC (2 mL) com gradiente segmentado de imidazol. As frações eluídas entre 100 e 300 mM de imadazol foram agrupadas. As frações purificadas apresentaram um banda com aproximadamente 32 e 12 kDa, correspondentes as proteínas HisDraT e GlnB, respectivamente. B – Perfil cromatográfico do complexo HisDraT-GlnB em coluna Superdex 200 (320 mL). Em destaque está representado o perfil eletroforético (Tricina-SDS-PAGE) das frações indicadas. Em todas as frações podem ser observadas bandas correspondentes a DraT e GlnB. Entretanto, o terceiro pico, correspondente ao complexo com razão molar 1:1 e peso molecular de aproximadamente 60 kDa foi a fração mais ativa e foi utilizada nos experimentos posteriores. Os géis foram corados com Coomassie Blue.

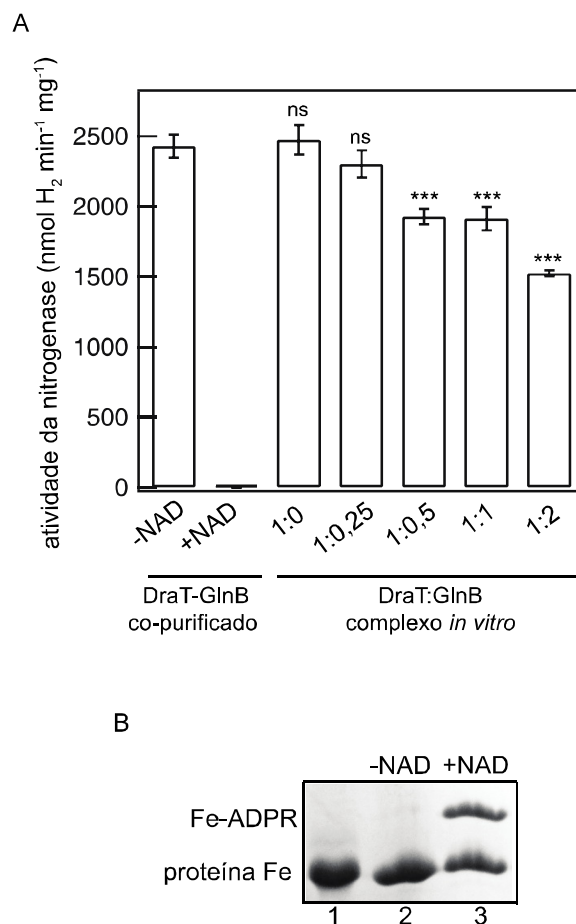


FIGURA 24 - ATIVIDADE E MODIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Fe APÓS ATIVIDADE DO COMPLEXO DraT-GlnB

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A – A atividade da proteína Fe foi determinada após incubação com diferentes razões molares DraT:GlnB (monômero:trímero) ou com o complexo DraT-GlnB obtido por co-purificação. As reações para atividade de DraT continham 2 mM NAD⁺, 1 mM MgCl₂, 1 mM ADP, 100 µg de proteína Fe de *A. vinelandii* e DraT ou complexo DraT-GlnB formado *in vitro* ou co-purificado. As reações foram incubadas por 5 min, 130 rpm a 30°C. As atividades foram realizadas utilizando a razão molar de 42:1 proteína Fe:DraT (dímero:monômero). Como controle, a reação foi realizada na presença de complexo DraT-GlnB formado *in vitro* ou co-purificado na ausência de NAD⁺. Os ensaios foram interrompidos pela redução de NAD⁺ a NADH com solução de ditionito e a atividade da proteína Fe foi determinada com adição de 500 µg de proteína MoFe e posteriormente, a quantidade de H₂ foi mensurada por cromatografia gasosa. ns – não significativo; ****p*<0,001. B – Modificação da proteína Fe de *A. vinelandii* dependente de NAD⁺ catalisada pelo complexo DraT-GlnB de *A. brasilense*. Linha 1, controle contendo proteína Fe de *A. vinelandii* não modificada. Linhas 2 e 3, a proteína Fe de *A. vinelandii* purificada foi incubada com o complexo co-purificado DraT-GlnB de *A. brasilense* na presença (linha 3) ou ausência (linha 2) de NAD⁺. As subunidades de proteína Fe não modificada e ADP-ribosilada foram separadas utilizando low-cross link SDS-PAGE e o gel foi corado com Coomassie blue. A porcentagem de Fe-ADPR e proteína Fe não modificada foi quantificada pelo programa Photoshop CS4, resultando em 42 e 58%, respectivamente.

6.6.1 Especificidade da ativação da DraT pelas proteína PII

A. brasilense codifica duas proteínas PII, GlnB e GlnZ (DE ZAMAROCZY, 1998). Para caracterizar a especificidade da regulação da atividade de DraT por proteínas PII e o *status* de uridililação destas proteínas, o ensaio para atividade de DraT foi realizado com o complexo formado *in vitro* com GlnB, GlnB-UMP₃, GlnZ e GlnZ-UMP₃ com razão molar 1:2 (DraT: proteína PII). As proteínas PII foram purificadas com a etapa de tratamento térmico 70°C/15 min e foram uridililadas de acordo com o protocolo descrito por Araujo *et al.* (2008). A Figura 25 mostra o resultado da uridililação *in vitro*. Aproximadamente 70% da GlnZ estava na sua forma completamente uridililada de acordo com as análises densitométricas.

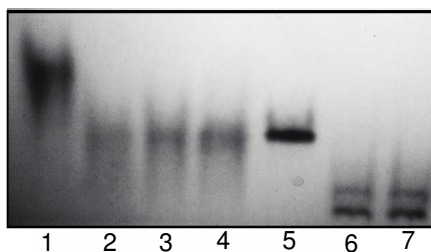


FIGURA 25 - URIDILILAÇÃO *in vitro* DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnZ UTILIZANDO GlnD DE *A. brasilense*

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Linha 1 mostra GlnB (1,5 µg). Linhas 2-4 correspondem a 1,0, 1,5 e 2,0 µg de GlnB-UMP₃. Linha 5 mostra GlnZ (1,5 µg). Linhas 6 e 7 correspondem a 1,0 e 1,5 µg de GlnZ-UMP₃. As reações foram realizadas utilizando 3 µM e 100 nM de proteína PII e GlnD. As reações foram incubadas por 30 min a 30°C. Depois da uridililação, GlnD-His foi removida com resina Magne-His e as amostras foram dialisadas para remover ATP e 2-oxoglutarato. Análise por eletroforese nativa (7,5%) e coloração com Coomassie Blue.

Trabalhos anteriores mostraram que somente GlnB interage com DraT em *A. brasilense* (HUERGO *et al.*, 2009; HUERGO *et al.*, 2006a). Com uma razão molar de 1:2 DraT:proteína PII, surpreendentemente, a GlnZ não uridililada foi capaz de ativar DraT com aproximadamente metade da eficiência de GlnB no complexo formado *in vitro*. Este resultado pode ser explicado pela alta similaridade entre estas duas proteínas (DE ZAMAROCZY, 1996) e pela estrutura de PII altamente conservada (FORCHHAMMER, 2008). Da mesma forma, ambas proteínas GlnB e GlnK de *R. capsulatus* foram capazes de interagir com DraT por ensaios de duplo-híbrido (PAWLOWSKI *et al.*, 2003). Nas mesmas condições, a atividade do complexo DraT-GlnB co-purificado foi de $130 \pm 2,5$ nmol de proteína Fe ADP-ribosilada min^{-1} mg DraT⁻¹, o que corresponde a 100% da ADP-ribosilação da proteína Fe e conseqüentemente total inibição da atividade da nitrogenase (Fig. 26).

A formação do complexo DraT-GlnB foi afetada pela uridililação de GlnB (HUERGO *et al.*, 2009). A utilização de GlnB-(UMP)₃ ou GlnZ-(UMP)₃ no ensaio de atividade de DraT também resultou em ativação de DraT significativa, ainda que duas vezes menor do que com GlnB (Fig. 26). Esta menor ativação pelas PII uridililadas corrobora com a incapacidade de variantes GlnB na região da volta T de *R. rubrum* que mimetizam parcialmente a uridililação desta proteína em interagir com DraT (ZHU *et al.*, 2006). Uma vez que a modificação ocorre na volta T de GlnB, este resultado sugere a importância desta região para ativar DraT. Para explorar o efeito da volta T, uma variante de GlnB com deleção parcial da volta T foi purificada e utilizada para formação do complexo *in vitro* com DraT. Esta variante GlnBΔ42-54 não ativou DraT significativamente *in vitro* (Fig. 26), reforçando a hipótese de que a região da volta T é a responsável pela regulação da atividade de DraT.

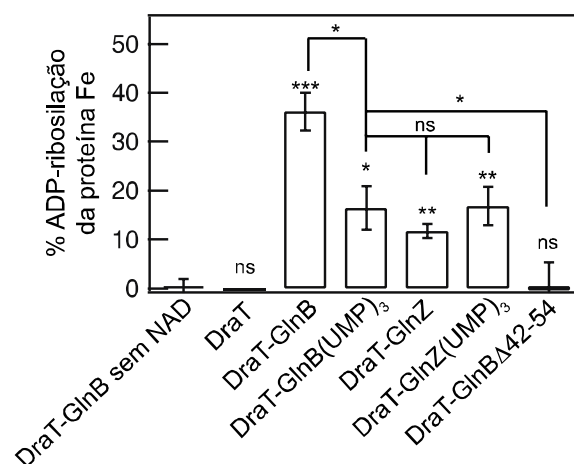


FIGURA 26 - REGULAÇÃO DE DraT POR PROTEÍNAS PII

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A porcentagem de ADP-ribosilação da proteína Fe corresponde a porcentagem de inibição da atividade da nitrogenase e foi utilizada para expressar a atividade de DraT. A atividade de DraT foi determinada indiretamente pela atividade da nitrogenase mensurando a evolução do hidrogênio. O ensaio de DraT foi realizado com proteína Fe de *A. vinelandii* como substrato na presença de diferentes proteínas PII. As reações que continham 2 mM NAD⁺, 1 mM MgCl₂, 1 mM ADP, 100 µg proteína Fe e DraT ou complexos DraT-P_{II} formados *in vitro* foram incubadas 5 min, 130 rpm at 30 °C. As reações foram feitas utilizando DraT: trîmero de P_{II} com razão molar 1:2 e proteína Fe: DraT com razão molar 21:1. Como controle foi utilizado o complexo DraT-GlnB (1:2) na ausência de NAD⁺. A atividade de DraT foi interrompida com a adição de solução de ditionito. A atividade da proteína Fe foi determinada com a adição de 500 µg de proteína MoFe e a produção de hidrogênio foi mensurada por cromatografia gasosa. ns – não significativo; **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001.

6.6.2 Efeito dos efetores de PII na ativação de DraT por GlnB

Para explorar o efeito dos efetores ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) na regulação da atividade do complexo DraT-GlnB, a atividade de DraT (no complexo

DraT-GlnB co-purificado) foi avaliada na presença de razões ATP/ADP em concentrações baixa (0,1 mM) e alta de 2-OG (2 mM), refletindo a faixa fisiológica destes efetores previamente reportada para *E. coli* (RADCHENKO *et al.*, 2010), bem como na ausência de 2-OG. Como pode ser observado na Figura 27, a atividade do complexo DraT-GlnB foi similar quando foi utilizado ADP sozinho ou na presença das três razões ATP/ADP utilizadas 1, 2 e 4, na ausência de 2-OG. Entretanto, a atividade do complexo foi reduzida significativamente na presença das razões ATP/ADP 2 e 4 em alta concentração de 2-OG (2 mM). Estes resultados estão de acordo com os resultados reportados para a interação *in vitro* entre DraT e GlnB de *A. brasilense*, onde mostrou-se que o complexo DraT-GlnB é estável na presença de Mg-ADP e desestabilizado na presença combinada de Mg-ATP e 2-OG (0,1 ou 2 mM) (HUERGO *et al.*, 2009). A presença de ATP (com quantidade residual de ADP proveniente da co-purificação do complexo DraT-GlnB) não foi capaz de ativar DraT, bem como na presença combinada de 2-OG (Fig. 28). Portanto, estes resultados suportam fortemente que somente a conformação da GlnB ligada a Mg-ADP é capaz de ativar DraT.

O Mg-ADP também promove associação entre PII outras proteínas. Na presença de Mg-ADP existe interação de PII e PipX, um co-ativador transcricional do fator de transcrição NtcA regulado por nitrogênio em cianobactéria e GlnK/Z e AmtB em *A. brasilense* e *E. coli* (ZETH *et al.*, 2012; FOKINA *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2011; LLÁCER *et al.*, 2010; RADCHENKO *et al.*, 2010). O efeito negativo de 2-OG na presença de ATP (ZETH *et al.*, 2012; GRUSWITZ *et al.*, 2007) ou presença de razões ATP/ADP na interação de PII com estes alvos também já foi reportada (LLÁCER *et al.*, 2010; RADCHENKO *et al.*, 2010). Além disso, o ADP parece antagonizar este efeito negativo de 2-OG (FOKINA *et al.*, 2011), o que poderia justificar a ausência de completa inibição mesmo na presença de ATP e 2-OG, uma vez que o ADP está presente (Fig. 27).

Presumivelmente, o efeito de 2-OG reflete em alterações conformacionais adicionais àquelas causadas pela desordem da volta T causada pela ligação ao ATP, contrapondo-se a conformação estendida na presença de ADP, levando a dissociação do complexo DraT-GlnB (SHETTY *et al.*, 2010; TRUAN *et al.*, 2010; XU *et al.*, 1998).

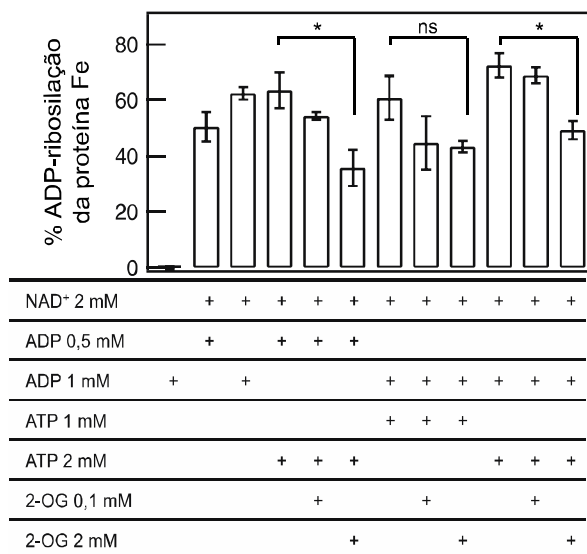


FIGURA 27 - EFEITO DE ADP, ATP E 2-OXOGLUTARATO NA ATIVIDADE DO COMPLEXO DRAT-GlnB

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A porcentagem de ADP-ribosilação da proteína Fe corresponde a porcentagem de inibição da atividade da nitrogenase e foi utilizada para expressar a atividade de DraT. A atividade de DraT foi determinada indiretamente pela atividade da nitrogenase mensurando a evolução do hidrogênio. O ensaio de DraT foi realizado com proteína Fe de *A. vinelandii* como substrato na presença de diferentes proteínas PII. As reações que continham 2 mM NAD^+ , 4 mM MgCl_2 , complexo DraT-GlnB co-purificado, 100 μg proteína Fe e efetores como indicado. Como controle, a reação foi realizada na ausência de NAD^+ . A atividade de DraT foi interrompida com a adição de solução de ditionito. A atividade da proteína Fe foi determinada com a adição de 500 μg de proteína MoFe e a produção de hidrogênio foi mensurada por cromatografia gasosa. ns – não significativo; * $p < 0,05$.

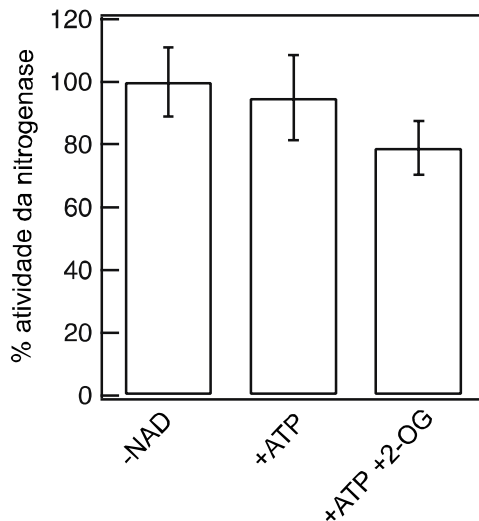


FIGURA 28 - EFEITO DE ATP E 2-OXOGLUTARATO NA ATIVIDADE DO COMPLEXO DraT-GlnB

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A atividade da nitrogenase foi determinada após incubação da proteína Fe com o complexo DraT-GlnB co-purificado mensurando a evolução do hidrogênio. O ensaio de DraT foi realizado com proteína Fe de *A. vinelandii* como substrato na presença de diferentes proteínas PII. As reações que continham 2 mM NAD^+ , 4 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 2 mM 2-OG, complexo DraT-GlnB co-purificado, 100 μg proteína Fe. Os efetores estão indicados. Como controle, a reação foi realizada na ausência de NAD^+ . A atividade de DraT foi interrompida com a adição de solução de ditionito. A atividade da proteína Fe foi determinada com a adição de 500 μg de proteína MoFe e a produção de hidrogênio foi mensurada por cromatografia gasosa.

6.6.3 Mecanismo de ativação de DraT por GlnB

Para investigar o mecanismo de ativação de DraT por GlnB, o K_m do complexo DraT-GlnB pelo NAD^+ foi determinado (Fig. 29). Dada a baixa atividade de DraT sozinha nas condições utilizadas, o K_m da DraT pelo NAD^+ não pode ser determinado. Para avaliar se a alteração da afinidade pelo NAD^+ explicaria a ativação da DraT por GlnB, valores de K_m de DraT pelo NAD^+ na presença de Mg-ADP previamente reportados foram utilizados para comparação com o obtido para o complexo DraT-GlnB (Tabela 6). Como pode ser observado, o K_m do complexo DraT-GlnB pelo NAD^+ tem a mesma ordem de magnitude do descrito para DraT de *R. rubrum* (Tabela 6). Este resultado sugere que a ligação de NAD^+ na DraT não é afetada quando GlnB está presente na formação do complexo. Diferentemente, o valor de k_{cat} para o complexo DraT-GlnB é bem maior do que para DraT sozinha (Tabela 6). Todavia, é conhecido que nem k_{cat} ou K_m são adequados para comparação de função catalítica, uma vez que o primeiro exclui a etapa de ligação do substrato, considerando a velocidade máxima da reação e a quantidade de enzima, ou seja, a frequência com

que a reação ocorre, e o último não considera a catálise, somente a ligação do substrato na enzima. Para contemplar ambos parâmetros, a razão k_{cat}/K_m foi determinada (Tabela 6). Com estes resultados pode ser afirmado que a GlnB aumenta, pelo menos, 18 vezes a eficiência catalítica da DraT na ADP-ribosilação da proteína Fe.

Apesar da maior eficiência catalítica do complexo DraT-GlnB, não pode ser afirmado se a afinidade da DraT pela proteína Fe é afetada pela ligação de GlnB, uma vez que o K_m não foi determinado. Assim, dada a necessidade de ligação prévia da proteína Fe a DraT para a ligação de NAD^+ (GRUNWALD e LUDDEN, 1997) e que o K_m pelo NAD^+ não é afetado por GlnB, provavelmente GlnB afete a eficiência catalítica e não a afinidade pela proteína Fe.

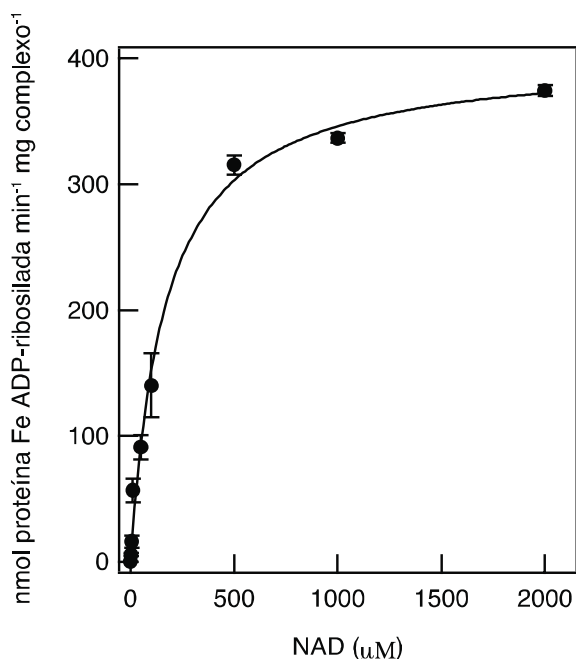


FIGURA 29 - DETERMINAÇÃO DO K_m PARA NAD^+ NA REAÇÃO DE ADP-RIBOSILAÇÃO DA PROTEÍNA FE DE *Azotobacter vinelandii* CATALISADA PELO COMPLEXO DRAT-GlnB

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: As reações contendo diferentes concentrações de NAD^+ , 1 mM $MgCl_2$, complexo DraT-GlnB co-purificado, 1 mM ADP e 100 μg Fe protein foram incubadas por 5 min, 130 rpm a 30°C. As reações foram feitas utilizando a razão molar de 125:1 de proteína Fe: DraT-GlnB. Como controle, foi realizada com reação na presença de complexo DraT-GlnB ou DraT na ausência de NAD^+ . A atividade de DraT foi interrompida com a adição de solução de ditionito. A atividade da proteína Fe foi determinada com a adição de 500 μg de proteína MoFe e a produção de hidrogênio foi mensurada por cromatografia gasosa. O K_m determinado foi de $166 \pm 24 \mu M$ e a V_{max} 403 ± 15 nmol de proteína Fe ADP-ribosilada $min^{-1} mg$ complexo $^{-1}$ (valores foram determinados utilizando o programa Igor Pro 6.02A).

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS PARA AS REAÇÕES CATALISADAS POR DraT DE *R. rubrum* OU COMPLEXO DraT-GlnB DE *A. brasilense* UTILIZANDO COMO ACEPTOR DE GRUPO ADP-RIBOSIL A PROTEÍNA Fe DE *A. vinelandii*.

	V_{max}^{a*}	$k_{cat} (s^{-1})^{b*}$	$K_m (\mu M)^{c*6}$	$k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})$	Referência
DraT-GlnB de <i>A. brasilense</i>	6,72	0,501	166	3018,1	Este trabalho
DraT de <i>R. rubrum</i>	0,072	0,0022	22	100	LOWERY e LUDDEN, 1989
DraT de <i>R. rubrum</i>	1,48	0,044	268	164,2	ZHANG <i>et al.</i> , 2001b

^anmol de ADP-ribose transferido $s^{-1} mg\ DraT^{-1}$ ou nmol proteína Fe ADP-ribosilada $s^{-1} mg$ (complexo DraT-GlnB)¹.

^bDraT foi considerada como 30 kDa e o complexo DraT-GlnB como 74.504 Da (calculado com base na sequência utilizando o programa ExPASy).

^c K_m pelo NAD⁺ na presença de Mg-ADP.

^{*} V_{max} e K_m para o complexo foram determinados pelo programa Igor Pro (versão 6.02A); V_{max} e K_m para DraT sozinha foram reportados pelos trabalhos; k_{cat} foi calculada pela quantidade de enzima total considerando seu peso molecular e a V_{max} .

6.7 MECANISMO DE INATIVAÇÃO DA PROTEÍNA Fe POR ADP-RIBOSILAÇÃO

A ADP-ribosilação da proteína Fe ocorre no resíduo de arginina 101 (homólogo 100 em *A. vinelandii*) em uma das subunidades do homodímero, resultando no desligamento da nitrogenase. A hipótese aceita para que apenas uma das duas subunidades idênticas seja modificada é que os resíduos de Arg101 estão muito próximos um do outro, no ponto de interação entre as subunidades (LUDDEN, 1994).

Na estrutura da proteína Fe de *A. vinelandii* os dois resíduos de Arg100 ocupam um sítio no final da hélice da superfície da proteína, estando muito próximos dos resíduos de Cys98 os quais servem, juntamente com Cys132, como ligantes do centro [4Fe-4S] na interface entre as duas subunidades (GEORGIADIS *et al.*, 1992). Além disso, a análise estrutural do complexo da nitrogenase revelou que o sítio de ADP-ribosilação está localizado na superfície de contato com a proteína MoFe (SCHINDELIN *et al.*, 1997). Para avaliar se a ADP-ribosilação poderia, de alguma forma, afetar o centro [4Fe-4S] dada a localização estrutural de Arg100 foram realizados experimentos de ressonância paramagnética electrónica (EPR). As análises mostraram que a ADP-ribosilação não afeta o estado eletrônico do centro [4Fe-4S]¹⁺ (no seu estado reduzido) e ligado a Mg-ADP (Fig. 30).

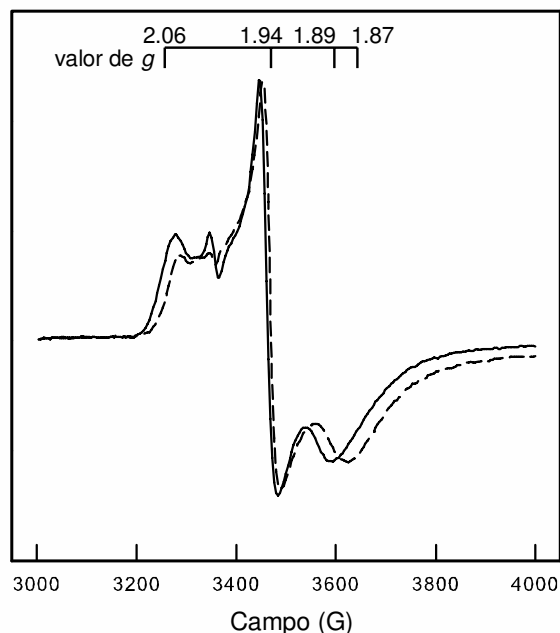


FIGURA 30 - ESPECTROS DE EPR DAS PROTEÍNAS Fe NÃO-MODIFICADA E ADP-RIBOSILADA DE *A. vinelandii*

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: As amostras de proteína Fe não-modificada (linha contínua) e ADP-ribosilada (linha descontínua) foram mantidas no seu estado reduzido pela presença de 2 mM de ditionito. Os espectros foram obtidos a 12 K, 9,5 GHz e 1 mW de potência de microndas. Os valores de g para cada pico estão mostrados.

O mecanismo de inativação da nitrogenase por ADP-ribosilação foi sugerido por Murrell *et al.* (1988). Neste trabalho, os autores utilizaram a propriedade da proteína Fe de *Clostridium pasteurianum* (Cp2) em formar um complexo fortemente ligado e inativo com a proteína MoFe de *A. vinelandii* (Av1) (EMERICH e BURRIS, 1976). Foi, então, realizado um ensaio de competição para avaliar a atividade da nitrogenase pela redução do acetileno a etileno. Quando Cp2 foi pré-incubada com DraT de *R. rubrum*, a atividade da nitrogenase de *A. vinelandii* foi reestabelecida. Assim, estes resultados forneceram a evidência de que a ADP-ribosilação da proteína Fe impede sua interação com a proteína MoFe (MURRELL *et al.*, 1988).

Danyal e colaboradores (2011) propuseram que a associação da proteína Fe ligada a Mg-ATP e a proteína MoFe no chamado *resting state* (estado de repouso) causa alterações conformacionais capazes de iniciar a transferência de elétrons, primeiramente entre o centro P e o co-fator FeMo. Somente posteriormente, o centro [4Fe-4S] repõe o elétron para o centro P, tornando-se oxidado. Este mecanismo foi denominado *deficit spending* e parece ser o mais provável para a transferência de elétrons na nitrogenase (DANYAL *et al.*, 2011). A oxidação da proteína Fe pode ser

observada pelo aumento da absorbância a 430 nm. Para avaliar se a proteína Fe ADP-ribosilada poderia associar-se mesmo que fracamente a MoFe, o que poderia induzir a primeira transferência de elétron, a alteração da absorbância a 430 nm foi monitorada. Para isso, todo o ADP proveniente da reação de ADP-ribosilação catalisada pelo complexo DraT-GlnB foi removido. A proteína Fe não-modificada ou ADP-ribosilada e MoFe foram misturadas com uma solução tampão contendo ATP e a absorbância a 430 nm foi monitorada entre 3 e 50 ms utilizando um equipamento de espectrofotometria de fluxo interrompido mantido em *glove box* na ausência de oxigênio. Como pode ser observado na Figura 31, existe aumento da absorbância a 430 nm quando as proteínas MoFe e Fe foram utilizadas na presença de ATP. Entretanto, não houve alteração na absorbância quando a proteína Fe ADP-ribosilada foi utilizada, bem como no controle na ausência de nucleotídeo (Fig. 31). Portanto, este resultado confirma definitivamente o mecanismo de ADP-ribosilação proposto por Murrell *et al.* (1988), onde a modificação impede a qualquer interação com a proteína Fe. Conseqüentemente, a atividade da nitrogenase é inibida, uma vez que não ocorre sequer a transferência do primeiro elétron.

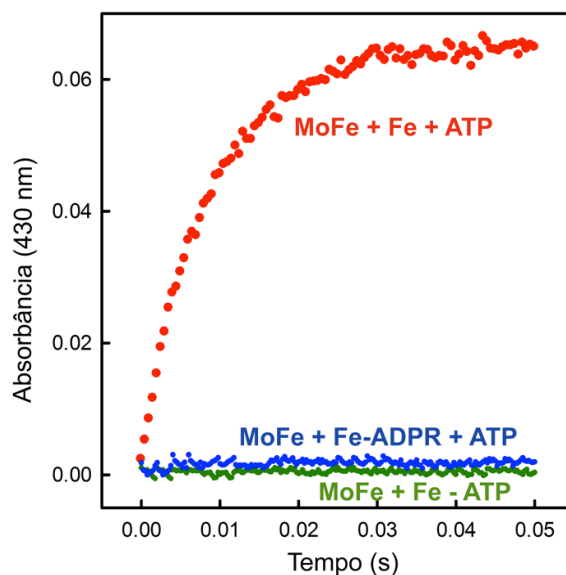


FIGURA 31 - TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRON DA PROTEÍNA Fe PARA A MoFe MONITORADA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUXO INTERROMPIDO
FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A absorbância a 430 nm foi monitorada após a mistura de proteína Fe não-modificada ou ADP-ribosilada (68 μ M) e proteína MoFe (18 μ M) em uma seringa com tampão 100 mM MOPS pH 7,4 e 18 mM Mg-ATP ou na ausência de nucleotídeo como controle.

6.8 REATIVAÇÃO DA PROTEÍNA Fe ADP-RIBOSILADA

O modelo atual para a regulação da atividade de DraG de *A. brasilense* sugere que em resposta a íons amônio, DraG interage com o complexo AmtB-GlnZ na membrana celular formando um complexo ternário (HUERGO *et al.*, 2007). De alguma forma ainda não identificada este processo inativaria DraG. Rajendran e colaboradores (2011) mostraram que DraG não foi regulada pela interação com GlnZ ou GlnZ/AmtB utilizando um substrato sintético análogo, dansil-arginina-ADP-ribose. Este resultado pode ser justificado pelo tamanho pequeno deste substrato, ao contrário do substrato natural, a proteína Fe ADP-ribosilada. Simulações *in silico* utilizando a estrutura da proteína Fe de *A. vinelandii* como modelo indicaram que a interação simultânea de GlnZ e proteína Fe é impossível, uma vez que as regiões de ligação em DraG estão sobrepostas (RAJENDRAN *et al.*, 2011). Assim, os autores postularam a hipótese de que o complexo binário DraG-GlnZ não seria suficientemente estável para inativar DraG e que, portanto, o complexo com AmtB seria necessário para a inativação de DraG (RAJENDRAN *et al.*, 2011). Para esclarecer esta hipótese, a atividade de DraG complexada ou não foi avaliada. Para este ensaio as proteínas DraG (Fig. 32), GlnZ e AmtB (Fig. 33) foram purificadas. A atividade de DraG foi avaliada indiretamente pela reativação da proteína Fe ADP-ribosilada de *A. vinelandii* por ensaio de nitrogenase (Fig. 34). Como controle de atividade da nitrogenase das condições de reação, a proteína Fe não modificada foi utilizada mostrando o efeito negativo do glicerol e detergente utilizados para a atividade da DraG. Baseado no valor de atividade deste controle, pode-se afirmar que aproximadamente 50% da proteína Fe foi reativada pela DraG tanto na presença de ATP quanto ADP. O complexo DraG-GlnZ formado *in vitro*, mesmo com alta razão molar de 1:40 (DraG:GlnZ) não foi capaz de inativar DraG. Em contrapartida, na presença de AmtB a atividade de DraG foi reduzida pela metade, mesmo com um excesso molar de 5 vezes (monômero de DraG: monômero de AmtB), confirmando a hipótese sugerida por Rajendran *et al.* (2011) (Fig. 34).

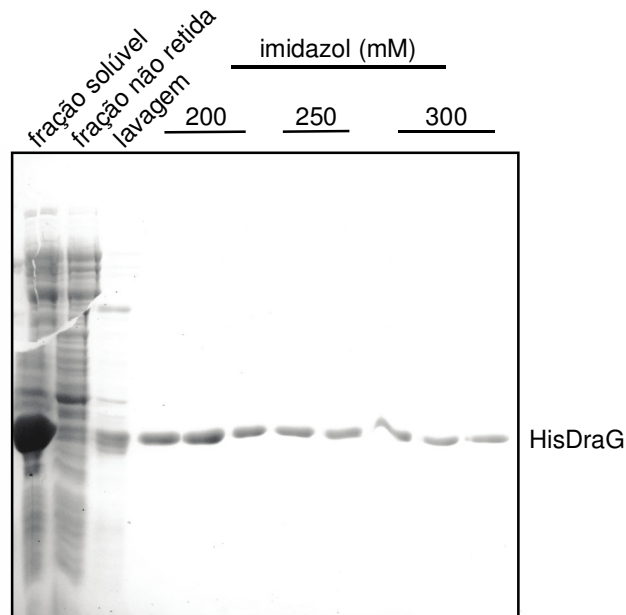


FIGURA 32. PERFIL DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DRAG DE *A. brasilense*
 FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A DraG foi purificada a partir da fração solúvel em coluna de afinidade. A fração não retida corresponde a amostra que não ligou na coluna durante a injeção e a lavagem corresponde a fração que não permaneceu ligada durante a lavagem após injeção da amostra. A proteína foi eluída com gradiente segmentado de imidazol. As frações purificadas apresentaram um banda com aproximadamente 32 kDa, correspondente a proteína HisDraG. Análise por SDS-PAGE (12%) e coloração com Coomassie Blue.

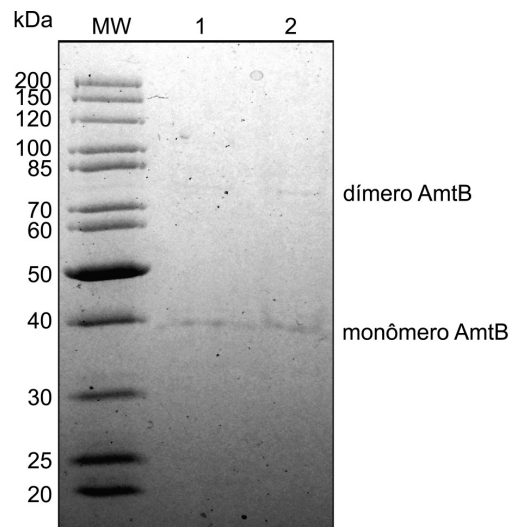


FIGURA 33 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA PROTEÍNA AmtB DE *A. brasilense*
 PURIFICADA

FONTE: A Autora (2012).

NOTA: Linha 1 corresponde a 2,4 µg e linha 2 a 3,2 µg de AmtB purificado. O padrão de peso molecular (MW) está representado como kDa. Análise por SDS-PAGE (12%) e coloração com Coomassie Blue.

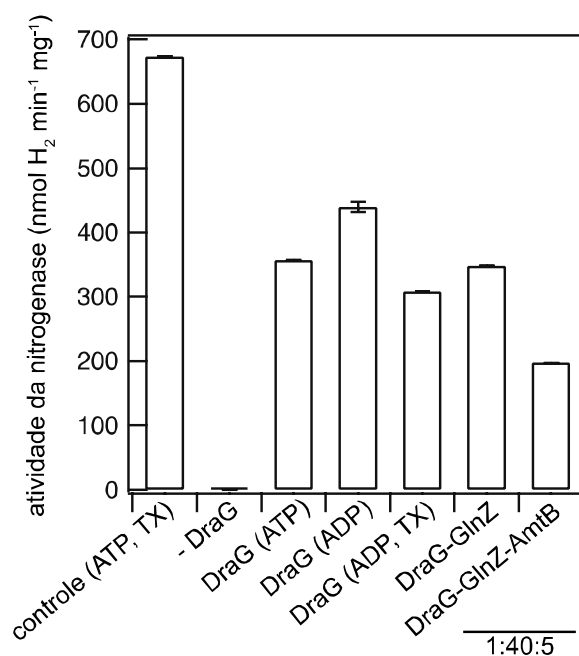


FIGURA 34 - REATIVAÇÃO DA PROTEÍNA Fe UTILIZANDO DraG DE *A. brasilense*
 FONTE: A Autora (2012).

NOTA: A atividade da proteína Fe foi determinada após incubação da proteína Fe ADP-ribosilada com DraG ou complexos DraG-GlnZ e DraG-GlnZ-AmtB na razão molar 1:40:5 (considerando monômero de DraG: trímero de GlnZ: monômero de AmtB). As proteínas purificadas foram incubadas com 2 mM MgCl₂ e 2 mM ADP/ATP (somente ADP para os complexos) por 16 horas a 4 °C. As reações para atividade de DraG continham 50 mM MOPS pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 5 mM ADP ou ATP and 0,03% Triton X-100 (TX), 150 µg de proteína Fe ADP-ribosilada de *A. vinelandii* e 10 µg DraG ou complexos DraG-GlnZ/AmtB formados *in vitro* foram incubadas por 20 min, 100 rpm a 30°C. Controle utilizando proteína Fe não modificada na presença do tampão da proteína AmtB foi utilizado para mostrar a interferência do glicerol e Triton X-100 na atividade da nitrogenase, avaliada pela produção de H₂.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Primeiramente, foi possível obter um protocolo de purificação simples, eficiente e reprodutível de proteínas PII nativas. Devido a alta estabilidade térmica destas proteínas, foi desenvolvida a adição de uma etapa de aquecimento anterior a injeção na coluna de heparina que melhorou a homogeneidade das amostras. A etapa de tratamento térmico não afetou a conformação global da GlnB de *A. brasilense* avaliada por análises de Ressonância Magnética Nuclear. Estes resultados foram publicados na revista *Protein Expression and Purification* (MOURE *et al.*, 2012). A segunda parte do trabalho dedicou-se a explorar o controle da atividade da DraT pela GlnB de *A. brasilense*. O único substrato conhecido para DraT é a proteína Fe na sua forma nativa, com seu centro metálico intacto (LOWERY e LUDDEN, 1988). Para realizar esta etapa, foi utilizada a proteína Fe de *A. vinelandii* e a atividade de DraT foi determinada indiretamente pela atividade da nitrogenase, mensurando a redução de prótons a H₂. Confirmando resultados anteriores de interação *in vitro* entre GlnB e DraT, foi demonstrado que na presença de Mg-ADP a atividade de DraT é estimulada por GlnB. A caracterização da regulação da atividade de DraT por GlnB de *A. brasilense*, a especificidade da reação, seu controle por efetores, a caracterização cinética da reação, bem como a confirmação do modelo proposto para o mecanismo de regulação da nitrogenase por ADP-ribosilação (MURREL *et al.*, 1988) foram realizados. Estes resultados foram publicados na revista *Journal of Bacteriology* (MOURE *et al.*, 2013). Finalmente, a reativação da proteína Fe ADP-ribosilada pela DraG foi avaliada na presença de complexos com GlnZ e AmtB de *A. brasilense*. O complexo ternário DraG-GlnZ-AmtB foi necessário para inibir a atividade de DraG, de acordo com o que foi sugerido por Rajendran e colaboradores (2011).

Com estes resultados foi possível confirmar o modelo de regulação da nitrogenase por íons amônio pelo sistema DraT/DraG baseado em interação proteína-proteína (HUERGO *et al.*, 2009; HUERGO *et al.*, 2007) pela avaliação da atividade *in vitro* de DraT e DraG com seu substrato natural, a proteína Fe (Fig. 35). Em condição de fixação de nitrogênio, o nível intracelular de glutamina é baixo, existe acúmulo de 2-OG e a razão ATP/ADP tem que ser alta para suportar a atividade da nitrogenase. Nesta condição, as PII, GlnB e GlnZ estão completamente uridililadas e se localizam no citoplasma. Na presença de ATP e 2-OG nos respectivos sítios de ligação existe uma provável alteração de conformação, principalmente na volta T, o que mantém DraT e DraG sozinhas (HUERGO *et al.*, 2009). Nesta condição, DraG está ativa com o consequente religamento da atividade nitrogenase e DraT está inativa. Quando os

níveis de amônio extracelular aumentam, a concentração de glutamina aumenta. A glutamina é um efetor positivo da atividade de desuridililação da GlnD das PII (JIANG *et al.*, 1998). O influxo de amônio reduz a concentração intracelular de 2-OG, que está sendo utilizado nas reações de assimilação de nitrogênio, assim como a razão ATP/ADP também é reduzida. As GlnB e GlnZ estão nas suas formas completamente desuridililadas. GlnB interage com DraT (HUERGO *et al.*, 2009) e estimula a atividade de DraT, inativando a nitrogenase e evitando desperdício de energia celular (MOURE *et al.*, 2013). Além disso, nesta condição o complexo GlnZ-DraG é sequestrado para a membrana celular (HUERGO *et al.*, 2007). Forma-se, então, um complexo ternário com o AmtB, inativando DraG, causando separação física de DraG e a proteína Fe ADP-ribosilada e impedindo a entrada de íons amônio (RAJENDRAN *et al.*, 2011). Desta forma, este modelo apresenta uma regulação que integra os níveis de nitrogênio, o *status* de carbono (provido pelos níveis de 2-OG) e a energia celular disponível (a razão ATP/ADP): a regulação pós-traducional da dinitrogenase redutase.

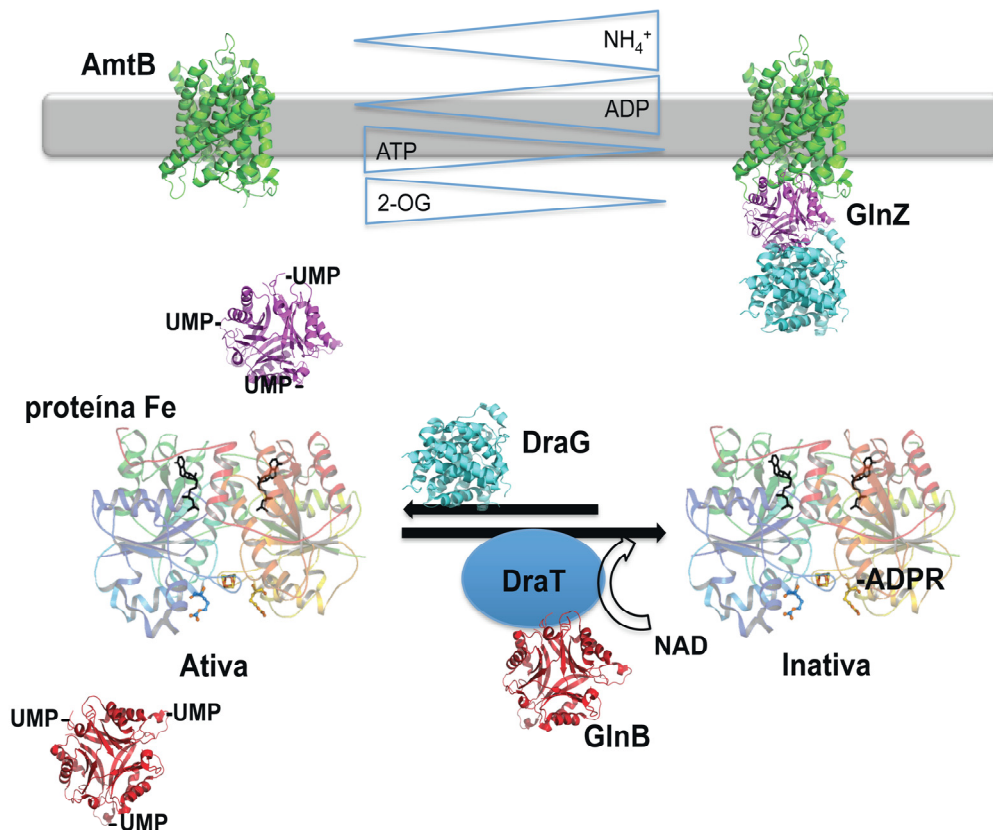


FIGURA 35 - MODELO PARA A REGULAÇÃO DO SISTEMA DRAT/DRAG NO CONTROLE DA ATIVIDADE DA NITROGENASE POR PROTEÍNAS PII EM *Azospirillum brasilense*
 FONTE: A Autora (2012).

8 CONCLUSÕES

- A adição de uma etapa de tratamento térmico (70°C/15 min e banho de gelo/15 min) aumentou a homogeneidade de preparações nativas de proteínas PII de 70 para >95%.
- A determinação dos valores de temperatura de *melting* utilizando Sypro Orange confirmou a alta estabilidade térmica de proteínas PII.
- Análises de RMN confirmaram que a proteína GlnB de *A. brasilense* é estável até 70°C e que as amostras obtidas com e sem tratamento térmico possuem a mesma conformação global;
- A interação entre 2-oxoglutarato e a proteína GlnB causou alterações no espectro de RMN 2D;
- Nas condições utilizadas nos ensaios, GlnB mostrou-se necessária para a atividade de DraT de *A. brasilense in vitro* utilizando a proteína Fe de *A. vinelandii* como substrato.
- As proteínas GlnZ, GlnB(UMP)₃ e GlnZ(UMP)₃ também foram capazes de ativar DraT, embora com menor eficiência.
- A variante com deleção parcial da volta T (GlnB Δ 42-54) não foi capaz de estimular DraT, o que sugeriu esta região como sítio de interação DraT-GlnB.
- A presença de alta concentração de 2-oxoglutarato na presença de alta razão ATP/ADP diminuiu a atividade do DraT-GlnB provavelmente por dissociação do complexo.
- A ADP-ribosilação da proteína Fe não afeta o estado eletrônico do seu centro metálico [4Fe-4S] e previne a transferência de elétron para a proteína MoFe por impedir a interação entre as duas proteínas.
- A formação do complexo ternário DraG-GlnZ-AmtB foi necessária para a inativação de DraG.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESEMOYE, A.; KLOEPPER, J. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 1–12, 2009.

ANDRADE, S. L. A.; DICKMANN, A.; FICNER, R.; EINSLE, O. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 102, n. 42, p. 14994–14999, 2005.

ARAÚJO, L M; HUERGO, L F; INVITTI, A. L. *et al.* Different responses of the GlnB and GlnZ proteins upon *in vitro* uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 289–294, 2008.

ARCONDÉGUY, T; VAN HEESWIJK, W C; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, n. 2, p. 263–270, 1999.

ARCONDÉGUY, TANIA; JACK, R.; MERRICK, MIKE. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80–105, 2001.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.

BARNEY, B. M.; IGARASHI, R. Y.; DOS SANTOS, P. C.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Substrate Interaction at an Iron-Sulfur Face of the FeMo-cofactor during Nitrogenase Catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 51, p. 53621–53624, 2004.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004.

BENELLI, E M; BUCK, M; DE SOUZA, E M; YATES, M G; PEDROSA, F O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Canadian journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 309–314, 2001.

BILLETER, M.; WAGNER, G.; WÜTHRICH, KURT. Solution NMR structure determination of proteins revisited. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 42, n. 3, p. 155–158, 2008.

BONATTO, ANA C; COUTO, G. H.; SOUZA, EMANUEL M; *et al.* Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 2, p. 293–299, 2007.

BONATTO, ANA C; SOUZA, EMANUEL M; OLIVEIRA, M. A. S. *et al.* Uridylylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate *in vitro*. **Archives of microbiology**, v. 194, n. 8, p. 643–652, 2012.

BOTHE, H.; FERGUSON, S.; NEWTON, W. E. **Biology of the Nitrogen Cycle: COST edition**. Elsevier, 2006.

BULEN, W. A.; LECOMTE, J. R. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 56, n. 3, p. 979–986, 1966.

BURGESS, B. K.; LOWE, D. J. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2983–3012, 1996.

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

CARR, P D; CHEAH, E; SUFFOLK, P. M. et al. X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 52, n. Pt 1, p. 93–104, 1996.

CHRISTIANSEN, J.; GOODWIN, P. J.; LANZILOTTA, W N; SEEFELDT, L C; DEAN, D R. Catalytic and biophysical properties of a nitrogenase Apo-MoFe protein produced by a *nifB*-deletion mutant of *Azotobacter vinelandii*. **Biochemistry**, v. 37, n. 36, p. 12611–12623, 1998.

CHUBATSU, L.; MONTEIRO, R.; DE SOUZA, EMANUEL; et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1, p. 197–207, 2012.

CONROY, M. J.; DURAND, A.; LUPO, D. et al. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n. 4, p. 1213–1218, 2007.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, MIKE. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **The EMBO journal**, v. 21, n. 4, p. 536–545, 2002.

DANYAL, K.; DEAN, DENNIS R.; HOFFMAN, B. M.; SEEFELDT, LANCE C. Electron Transfer within Nitrogenase: Evidence for a Deficit-Spending Mechanism. **Biochemistry**, v. 50, n. 43, p. 9255–9263, 2011.

DING, K.; ITHYCHANDA, S.; QIN, J. Three-dimensional correlated accordion NMR spectroscopy of proteins. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 180, n. 2, p. 203–209, 2006.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DREPPER, T.; GROSS, S.; YAKUNIN, A. F. et al. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**, v. 149, p. 2203–2212, 2003.

EDWARDS, A. J.; REID, D. Introduction to NMR of Proteins. **Current Protocols in Protein Science**, 2001.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, imprensa 2008. www.embrapa.br. Acesso em julho de 2012.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, imprensa 2005. www.embrapa.br. Acesso em julho de 2012.

EMERICH, D.; BURRIS, R. Interactions of heterologous nitrogenase components that generate catalytically inactive complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 73, n. 12, p. 4369, 1976.

EPPS, D. E.; SARVER, R. W.; ROGERS, J. M.; HERBERG, J. T.; TOMICH, P. K. The ligand affinity of proteins measured by isothermal denaturation kinetics. **Analytical Biochemistry**, v. 292, n. 1, p. 40–50, 2001.

FADEL-PICHETH, C.; SOUZA, E.; RIGO, L. et al. Regulation of *Azospirillum brasilense* *nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281–288, 1999.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, n. 2, p. 99–108, 2012.

FOKINA, O.; CHELLAMUTHU, V.-R.; FORCHHAMMER, KARL; ZETH, K. Mechanism of 2-Oxoglutarate Signaling by the *Synechococcus elongatus* PII Signal Transduction Protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 107, n. 46, p. 19760–19765, 2010.

FOKINA, O.; HERRMANN, C.; FORCHHAMMER, KARL. Signal-transduction protein PII from *Synechococcus elongatus* PCC 7942 senses low adenylate energy charge *in vitro*. **Biochemical Journal**, v. 440, n. 1, p. 147–156, 2011.

FORCHHAMMER, K; HEDLER, A.; STROBEL, H.; WEISS, V. Heterotrimerization of PII-like signalling proteins: implications for PII-mediated signal transduction systems. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 338–349, 1999.

FORCHHAMMER, KARL. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 319–333, 2004.

FORCHHAMMER, KARL. PII signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 65–72, 2008.

GALLON, J. R.; CHENG, J.; DOUGHERTY, L. J. *et al.* A novel covalent modification of nitrogenase in a cyanobacterium. **FEBS Letters**, v. 468, n. 2–3, p. 231–233, 2000.

GEORGIADIS, M. M.; KOMIYA, H.; CHAKRABARTI, P. *et al.* Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Science**, v. 257, n. 5077, p. 1653–1659, 1992.

GERHARDT, E. C. M.; ARAUJO, L. M.; RIBEIRO, R. R. *et al.* Influence of the ADP/ATP ratio, 2-oxoglutarate and divalent ions on *Azospirillum brasilense* PII protein signalling. **Microbiology**, v. 158, p. 1656–1663, 2012.

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

GRUNWALD, S.K.; LIES, D. P.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum* strains overexpressing the regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase activating glycohydrolase. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 3, p. 628, 1995.

GRUNWALD, S.K.; RYLE, M.J.; LANZILOTTA, W.N.; LUDDEN, P.W. ADP-ribosylation of variants of *Azotobacter vinelandii* dinitrogenase reductase by *Rhodospirillum rubrum* dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 9, p. 2597, 2000.

GRUSWITZ, F.; O'CONNELL, J., 3rd; STROUD, R. M. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n. 1, p. 42–47, 2007.

HALBLEIB, C M; ZHANG, Y; LUDDEN, P W. Regulation of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3493–3500, 2000.

HALBLEIB, C.M.; LUDDEN, P.W. Characterization of the interaction of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase from *Rhodospirillum rubrum* with bacterial membranes. **Archives of Microbiology**, v. 172, n. 1, p. 51–58, 1999.

HALBLEIB, CALE M.; LUDDEN, PAUL W. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1081–1084, 2000.

HARTMANN, A.; BURRIS R.H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 3, p. 944, 1987.

HELFMANN, S.; LÜ, W.; LITZ, C.; ANDRADE, S. L. A. Cooperative binding of MgATP and MgADP in the trimeric P(II) protein GlnK2 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, n. 1, p. 165–177, 2010.

HOCHULI, M.; SZYPERSKI, T; WÜTHRICH, K. Deuterium isotope effects on the central carbon metabolism of *Escherichia coli* cells grown on a D₂O-containing minimal medium. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 17, n. 1, p. 33–42, 2000.

HU, Y.; RIBBE, M. W. Historic Overview of Nitrogenase Research. In: M. W. Ribbe; J. M. Walker (Eds.); **Nitrogen Fixation**, Methods in Molecular Biology.. v. 766, p.3–7, 2011.

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

HUERGO, L. F.; MERRICK, M.; MONTEIRO, R. A. *et al.* In Vitro Interactions between the PII Proteins and the Nitrogenase Regulatory Enzymes Dinitrogenase Reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 11, p. 6674–6682, 2009.

HUERGO, L.F.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M. *et al.* Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Letters**, v. 580, n. 22, p. 5232–5236, 2006a.

HUERGO, L.F.; FILIPAKI, A.; CHUBATSU, L.S. *et al.* Effect of the over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 1, p. 47–54, 2005a.

HUERGO, L.F.; MERRICK, M.; PEDROSA, F.O. *et al.* Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 1523–1535, 2007.

HUERGO, L.F.; SOUZA, E.M.; ARAUJO, M. S. *et al.* ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 326–337, 2006b.

HUERGO, L. F; PEDROSA, F. O; MULLER-SANTOS, M. *et al.* PII Signal Transduction Proteins: Pivotal Players in Post-Translational Control of Nitrogenase Activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 176–190, 2012a.

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, p. n/a–n/a, 2012b.

HUERGO, L. F.; SOUZA, EMANUEL M.; STEFFENS, M. B. R. *et al.* Effects of over-expression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium-dependent post-translational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v. 183, n. 3, p. 209–217, 2005b.

INABA, J. **Caracterização funcional da proteína GlnB de *Azospirillum brasilense***. Curitiba, 2009. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

INABA, J.; HUERGO, L. F.; BONATTO, A. C. *et al.* *Azospirillum brasilense* PII proteins GlnB and GlnZ do not form heterotrimers and GlnB shows a unique trimeric uridylylation pattern. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 94–99, 2009.

JIANG, P.; NINFA, A. J. *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Controlling Nitrogen Assimilation Acts As a Sensor of Adenylate Energy Charge *in vitro*. **Biochemistry**, v. 46, n. 45, p. 12979–12996, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Sensation and Signaling of α -Ketoglutarate and Adenylate Energy Charge by the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Require Cooperation of the Three Ligand-Binding Sites within the PII Trimer. **Biochemistry**, v. 48, n. 48, p. 11522–11531, 2009.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological Characterization of the Signal-Transducing Uridylyltransferase/Uridylyl-Removing Enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and Its Interaction with the PII Protein. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 12782–12794, 1998.

KANEMOTO, R. H.; LUDDEN, P W. Effect of Ammonia, Darkness, and Phenazine Methosulfate on Whole-Cell Nitrogenase Activity and Fe Protein Modification in *Rhodospirillum Rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 158, n. 2, p. 713–720, 1984.

KAY, L. E. Protein dynamics from NMR. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 5, p. 513–517, 1998.

KHADEMI, S.; O'CONNELL, J.; REMIS, J. *et al.* Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1587–1594, 2004.

KLASSEN, G.; DE SOUZA, E.M.; YATES, M.G. *et al.* Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 22, p. 6710, 2001.

KLASSEN, G.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; *et al.* Nitrogenase Switch-Off by Ammonium Ions in *Azospirillum Brasilense* Requires the GlnB Nitrogen Signal-Transducing Protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5637–5641, 2005.

KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 2, p. 87–100, 1985.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LANCASTER, K. M.; ROEMELT, M.; ETTENHUBER, P. *et al.* X-Ray Emission Spectroscopy Evidences a Central Carbon in the Nitrogenase Iron-Molybdenum Cofactor. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 974–977, 2011.

LANZILOTTA, WILLIAM N.; PARKER, V. D.; SEEFELDT, LANCE C. Thermodynamics of nucleotide interactions with the *Azotobacter vinelandii* nitrogenase iron protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1429, n. 2, p. 411–421, 1999.

LANZILOTTA, WILLIAM N.; FISHER, K.; SEEFELDT, LANCE C. Evidence for Electron Transfer from the Nitrogenase Iron Protein to the Molybdenum–Iron Protein without MgATP Hydrolysis: Characterization of a Tight Protein–Protein Complex. **Biochemistry**, v. 35, n. 22, p. 7188–7196, 1996.

LI, X.-D.; HUERGO, LUCIANO F.; GASPERINA, ANTONIETTA; *et al.* Crystal Structure of Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase (DRAG) Reveals Conservation in the ADP-Ribosylhydrolase Fold and Specific Features in the ADP-Ribose-binding Pocket. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 4, p. 737–746, 2009.

LIANG, Y. Y.; ARSÈNE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the ntrBC genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Molecular & General Genetics**, v. 240, n. 2, p. 188–196, 1993.

LINDORFF-LARSEN, K.; BEST, R. B.; DEPRISTO, M. A.; DOBSON, C. M.; VENDRUSCOLO, M. Simultaneous determination of protein structure and dynamics. **Nature**, v. 433, n. 7022, p. 128–132, 2005.

LLÁCER, J. L.; CONTRERAS, A.; FORCHHAMMER, KARL; *et al.* The Crystal Structure of the Complex of PII and Acetylglutamate Kinase Reveals How PII Controls the Storage of Nitrogen as Arginine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n. 45, p. 17644–17649, 2007.

LLÁCER, J. L.; ESPINOSA, J.; CASTELLS, M. A. *et al.* Structural basis for the regulation of NtcA-dependent transcription by proteins PipX and PII. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 107, n. 35, p. 15397–15402, 2010.

LOWERY, R. G.; LUDDEN, P W. Purification and Properties of Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 32, p. 16714–16719, 1988.

LOWERY, R. G.; LUDDEN, P W. Effect of nucleotides on the activity of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from *Rhodospirillum rubrum*. **Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 4956–4961, 1989.

LOWERY, R. G.; SAARI, L. L.; LUDDEN, P W. Reversible Regulation of the Nitrogenase Iron Protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-Ribosylation *in vitro*. **Journal of Bacteriology**, v. 166, n. 2, p. 513–518, 1986.

LUDDEN, PAUL W. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in procaryotes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 138, n. 1, p. 123–129, 1994.

LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y.; BARNEY, BRETT M; *et al.* Unification of Reaction Pathway and Kinetic Scheme for N₂ Reduction Catalyzed by Nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, n. 15, p. 5583–5587, 2012.

MACHADO BENELLI, E.; BUCK, MARTIN; POLIKARPOV, I. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 13, p. 3296–3303, 2002.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549–553, 1991.

MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S. *et al.* The ntrBC genes of *Azospirillum brasilense* are part of a nifR3-like–ntrB–ntrC operon and are negatively regulated. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 674–684, 1995.

MAIER, S.; SCHLEBERGER, P.; LÜ, W. *et al.* Mechanism of Disruption of the Amt-GlnK Complex by PII-Mediated Sensing of 2-Oxoglutarate. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26327, 2011.

MARTIN, D. E.; REINHOLD-HUREK, B. Distinct roles of P(II)-like signal transmitter proteins and amtB in regulation of nif gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 8, p. 2251–2259, 2002.

MASEPOHL, B.; FORCHHAMMER, K. Regulatory Cascades To Express Nitrogenases. **Biology of the nitrogen cycle. Elsevier, Amsterdam**, p. 131–145, 2007.

MCINTOSH, L. P.; GRIFFEY, R. H.; MUCHMORE, D. C. *et al.* Proton NMR measurements of bacteriophage T4 lysozyme aided by 15N isotopic labeling: structural and dynamic studies of larger proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 84, n. 5, p. 1244–1248, 1987.

MERRICK, MJ; EDWARDS, R. Nitrogen control in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 59, n. 4, p. 604, 1995.

MIZUNO, Y.; BERENGER, B.; MOORHEAD, G. B. G.; NG, KENNETH K-S. Crystal structure of *Arabidopsis* PII reveals novel structural elements unique to plants. **Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1477–1483, 2007a.

MIZUNO, Y.; MOORHEAD, G. B. G.; NG, KENNETH K. -S. Structural Basis for the Regulation of N-Acetylglutamate Kinase by PII in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35733–35740, 2007b.

MONTELIONE, G. T.; ZHENG, D.; HUANG, Y. J.; GUNSALUS, K. C.; SZYPERSKI, THOMAS. Protein NMR spectroscopy in structural genomics. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 7, p. 982–985, 2000.

MORTENSON, L.E.; MORRIS, J. A.; JENG, D. Y. Purification, metal composition and properties of molybdo-ferredoxin and azoferredoxin, two of the components of the nitrogen-fixing system of *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 141, n. 3, p. 516–522, 1967.

MOURE, V. R.; KARAMATULLAH D.; YANG, Z.-Y.; WENDROTH, S. *et al.* The Nitrogenase Regulatory Enzyme Dinitrogenase Reductase ADP- Ribosyltransferase (DraT) Is Activated by Direct Interaction with the Signal Transduction Protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279-286, 2013.

MOURE, V. R.; RAZZERA, G.; ARAÚJO, LUÍZA M. *et al.* Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 1, p. 83–88, 2012.

MURRELL, S. A.; LOWERY, R. G.; LUDDEN, P W. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase from *Clostridium pasteurianum* prevents its inhibition of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Biochemical Journal**, v. 251, n. 2, p. 609–612, 1988.

NICHOLS, C. E.; SAINSBURY, S.; BERROW, N. S. *et al.* Structure of the PII signal transduction protein of *Neisseria meningitidis* at 1.85 Å resolution. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, p. 494–497, 2006.

NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 2007.

NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R. PII signal transduction proteins. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 172–179, 2000.

NOINDORF, L.; BONATTO, A.; MONTEIRO, R. *et al.* Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 8, 2011.

NORDLUND, S.; TRIPLETT, E. W. Regulation of nitrogenase activity in phototrophic bacteria by reversible covalent modification, p. 149–164, 2000.

PALMER, A. G., 3rd; GREY, M. J.; WANG, C. Solution NMR spin relaxation methods for characterizing chemical exchange in high-molecular-weight systems. **Methods in Enzymology**, v. 394, p. 430–465, 2005.

PALMER III, A. G. Probing molecular motion by NMR. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 732–737, 1997.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.-U.; KLIPP, W. *et al.* Yeast Two-Hybrid Studies on Interaction of Proteins Involved in Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 17, p. 5240–5247, 2003.

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

PERVUSHIN, K. The use of TROSY for detection and suppression of conformational exchange NMR line broadening in biological macromolecules. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 20, n. 3, p. 275–285, 2001.

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

PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. **Soils and Environmental Quality**. Lewis Publishers, 1994.

PONNURAJ, R. K.; RUBIO, L. M.; GRUNWALD, SANDRA K.; LUDDEN, PAUL W. NAD-, NMN-, and NADP-dependent modification of dinitrogenase reductases from *Rhodospirillum rubrum* and *Azotobacter vinelandii*. **FEBS Letters**, v. 579, n. 25, p. 5751–5758, 2005.

PORTUGAL, M. E. G.; SOUZA, E M; PEDROSA, F O; BENELLI, E M. *Streptococcus mutans* GlnK protein: an unusual PII family member. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 5, p. 394–401, 2011.

QUIVIGER, B.; FRANCHE, C.; LUTFALLA, G. *et al.* Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. **Biochimie**, v. 64, n. 7, p. 495–502, 1982.

RADCHENKO, M.; MERRICK, MIKE. The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 1, p. 189–194, 2011.

RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Control of AmtB-GlnK Complex Formation by Intracellular Levels of ATP, ADP, and 2-Oxoglutarate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 40, p. 31037–31045, 2010.

RAJENDRAN, C.; GERHARDT, E.C.M.; BJELIC, S. *et al.* Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of PII-target interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, n. 47, p. 18972–18976, 2011.

RAZZERA, G. **Estudos Estruturais dos Enovelamentos Protéicos de Defensinas e Globinas Através de Ressonância Magnética Nuclear**. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

REITZER, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 155–176, 2003.

RODRIGUES, THIAGO E; SOUZA, V. E. P.; MONTEIRO, R. A. *et al.* *In vitro* interaction between the ammonium transport protein AmtB and partially uridylylated forms of the P(II) protein GlnZ. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, n. 9, p. 1203–1209, 2011.

RYLE, MATTHEW J; LANZILOTTA, WILLIAM N; SEEFELDT, LANCE C; SCARROW, R. C.; JENSEN, G. M. Circular Dichroism and X-Ray Spectroscopies of *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase Iron Protein MgATP and MgADP Induced Protein Conformational Changes Affecting the [4Fe-4S] Cluster and Characterization of a [2Fe-2S] form. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 3, p. 1551–1557, 1996.

SAARI, L. L.; TRIPLETT, E. W.; LUDDEN, P. W. Purification and Properties of the Activating Enzyme for Iron Protein of Nitrogenase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 24, p. 15502–15508, 1984.

Sanders, J.K.M., Hunter, B.K. **Modern NMR spectroscopy – a guide for chemists**. Oxford University Press, New York, 1993.

SAKAI, H.; WANG, HONGFEI; TAKEMOTO-HORI, C. *et al.* Crystal structures of the signal transducing protein GlnK from *Thermus thermophilus* HB8. **Journal of structural biology**, v. 149, n. 1, p. 99–110, 2005.

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

SATTLER, M.; FESIK, S. W. Use of deuterium labeling in NMR: overcoming a sizeable problem. **Structure**, v. 4, n. 11, p. 1245–1249, 1996.

SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHLESSMAN, J. L.; HOWARD, J. B.; REES, DOUGLAS C. Structure of ADP.AIF₄-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature**, v. 387, n. 6631, p. 370–376, 1997.

SCHWARZENBACHER, R.; VON DELFT, F.; ABDUBEK, P. *et al.* Crystal structure of a putative PII-like signaling protein (TM0021) from *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. **Proteins**, v. 54, n. 4, p. 810–813, 2004.

SEEFELDT, L C; MORGAN, T. V.; DEAN, D R; MORTENSON, L E. Mapping the Site(s) of MgATP and MgADP Interaction with the Nitrogenase of *Azotobacter vinelandii*. Lysine 15 of the Iron Protein Plays a Major Role in MgATP Interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6680–6688, 1992.

SEEFELDT, LANCE C; MORTENSON, LEONARD E. Increasing nitrogenase catalytic efficiency for MgATP by changing serine 16 of its Fe protein to threonine: Use of Mn²⁺ to show interaction of serine 16 with Mg²⁺. **Protein Science**, v. 2, n. 1, p. 93–102, 1993.

SEEFELDT, LANCE C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, DENNIS R. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 701–722, 2009.

SHETTY, N. D.; REDDY, M. C. M.; PALANINATHAN, S. K.; OWEN, J. L.; SACCHETTINI, J. C. Crystal structures of the apo and ATP bound *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen regulatory PII protein. **Protein Science**, v. 19, n. 8, p. 1513–1524, 2010.

SHIH, P.; HOLLAND, D. R.; KIRSCH, J. F. Thermal stability determinants of chicken egg-white lysozyme core mutants: hydrophobicity, packing volume, and conserved buried water molecules. **Protein Science**, v. 4, n. 10, p. 2050–2062, 1995.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, n. 4653, p. 1095–1097, 1984.

SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p. 8690–8695, 1987.

SOUZA, E M; PEDROSA, F O; DRUMMOND, M.; RIGO, L U; YATES, M G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 2, p. 681–684, 1999.

SPATZAL, T.; AKSOYOGLU, M.; ZHANG, L. *et al.* Evidence for Interstitial Carbon in Nitrogenase FeMo Cofactor. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 940–940, 2011.

STRANDBERG, G. W.; WILSON, P. W. Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 25–31, 1968.

TREMBLAY, P.-L.; DREPPER, T.; MASEPOHL, BERND; HALLENBECK, P. C. Membrane Sequestration of PII Proteins and Nitrogenase Regulation in the Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 16, p. 5850–5859, 2007.

TRUAN, D.; HUERGO, L.F.; CHUBATSU, L.S. *et al.* A new PII protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 531–539, 2010.

TUGARINOV, V.; KANELIS, V.; KAY, L. E. Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 749–754, 2006.

VASUDEVAN, S G; GEDYE, C.; DIXON, N. E. *et al.* *Escherichia coli* PII protein: purification, crystallization and oligomeric structure. **FEBS Letters**, v. 337, n. 3, p. 255–258, 1994.

VENTERS, R. A.; THOMPSON, R.; CAVANAGH, J. Current approaches for the study of large proteins by NMR. **Journal of Molecular Structure**, v. 602–603, n. 0, p. 275–292, 2002.

WANG, H.; FRANKE, C. C.; NORDLUND, S.; NORÉN, A. Reversible membrane association of dinitrogenase reductase activating glycohydrolase in the regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*; dependence on GlnJ and AmtB1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 2, p. 273–279, 2005.

WISHART, D.S.; SYKES, B.D.; RICHARDS, F. M. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 222, n. 2, p. 311–333, 1991.

WISHART, DAVID S.; BIGAM, C. G.; YAO, J. *et al.* ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 2, p. 135–140, 1995.

XIA, Z.; NGUYEN, B. D.; BRUNORI, M.; CUTRUZZOLÀ, F.; LA MAR, G. N. ^1H -NMR study of the effect of α through reversible unfolding on the heme pocket molecular structure and magnetic properties of *Aplysia limacina* cyano-metmyoglobin. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 6, p. 4149–4158, 2005.

XU, Y; CARR, P D; HUBER, T.; VASUDEVAN, S G; OLLIS, D L. The structure of the PII-ATP complex. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 7, p. 2028–2037, 2001.

XU, YIBIN; CARR, PAUL D.; CLANCY, P. *et al.* The structures of the PII proteins from the cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC

6803. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 59, n. 12, p. 2183–2190, 2003.

XU, YIBIN; CHEAH, EONG; CARR, PAUL D; *et al.* GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, n. 1, p. 149–165, 1998.

YANG, Z.-Y.; DEAN, DENNIS R.; SEEFELDT, LANCE C. Molybdenum Nitrogenase Catalyzes the Reduction and Coupling of CO to Form Hydrocarbons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 19417–19421, 2011.

YANG, Z.-Y.; MOURE, V.R.; DEAN, DENNIS R.; SEEFELDT, LANCE C. Carbon dioxide reduction to methane and coupling with acetylene to form propylene catalyzed by remodeled nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, n. 48, p. 19644–19648, 2012.

YILDIZ, Ö.; KALTHOFF, C.; RAUNSER, S.; KÜHLBRANDT, W. Structure of GlnK1 with bound effectors indicates regulatory mechanism for ammonia uptake. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 2, p. 589–599, 2007.

YUAN, J.; DOUCETTE, C. D.; FOWLER, W. U. *et al.* Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 1, 2009.

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

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

DE ZAMAROCZY, MIKLOS. Structural homologues PII and Pz of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 449–463, 1998.

ZETH, K.; FOKINA, O.; FORCHHAMMER, KARL. An engineered PII protein variant that senses a novel ligand: atomic resolution structure of the complex with citrate. **Acta Crystallographica Section D**, v. 68, n. 8, p. 901–908, 2012.

ZHANG, Y; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P W; ROBERTS, G P. Comparison studies of dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase/dinitrogenase reductase activating glycohydrolase regulatory systems in *Rhodospirillum rubrum* and *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2354–2359, 1995.

ZHANG, Y; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P W; ROBERTS, G P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, n. 2, p. 195–204, 1997.

ZHANG, Y; POHLMANN, E L; HALBLEIB, C M; LUDDEN, P W; ROBERTS, G P. Effect of P(II) and its homolog GlnK on reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase by heterologous expression of the *Rhodospirillum rubrum* dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase-dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase regulatory system in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1610–1620, 2001a.

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

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P W; ROBERTS, G P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6781–6788, 1993.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 10, p. 2948–2953, 1996.

ZHANG, Y.; BURRIS, R.; ROBERTS, G. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 10, p. 3364, 1992.

ZHANG, Y.; KIM, K.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Isolation and characterization of *draT* mutants that have altered regulatory properties of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase in *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 193, 2001b.

ZHANG, YAOPING; POHLMANN, EDWARD L; LUDDEN, PAUL W; ROBERTS, GARY P. Functional Characterization of Three GlnB Homologs in the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*: Roles in Sensing Ammonium and Energy Status. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6159–6168, 2001.

ZHAO, M.-X.; JIANG, Y.-L.; XU, B.-Y. *et al.* Crystal Structure of the Cyanobacterial Signal Transduction Protein PII in Complex with PipX. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, n. 3, p. 552–559, 2010.

ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNÈCHE, S.; WINKLER, FRITZ K.; LI, X.-D. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, n. 49, p. 17090–17095, 2004.

ZHU, Y.; CONRAD, M. C.; ZHANG, YAOPING; ROBERTS, GARY P. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB Variants That Are Altered in Their Ability To Interact with Different Targets in Response to Nitrogen Status Signals. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 1866–1874, 2006.