

RICARDO ALVES DA ROCHA

MODELAGEM MATEMÁTICA DA PROTEÍNA GlnB DE *Escherichia coli*:
INTERAÇÃO COM EFETORES ALOSTÉRICOS E URIDILILAÇÃO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Bioquímica, no curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell
Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Rocha, Ricardo Alves da

Modelagem matemática da proteína GinB de *Escherichia coli*: interação com efetores alostéricos e uridililação. / Ricardo Alves da Rocha. – Curitiba, 2013.

96 f.: il. ; 30cm.

Orientador: David Alexander Mitchell

Co-orientador: Luciano Fernandes Huergo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. *Escherichia coli* 2. Bactérias gram-negativas I. Título II. Huergo, Luciano Fernandes III. Mitchell, David Alexander IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.96

TERMO DE APROVAÇÃO

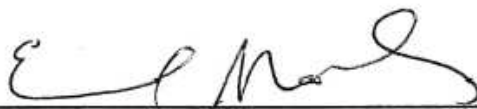
RICARDO ALVES DA ROCHA

MODELAGEM MATEMÁTICA DA PROTEÍNA GlnB DE *Escherichia coli*: INTERAÇÃO COM EFETORES ALOSTÉRICOS E URIDILILAÇÃO

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



Prof. Dr. David Alexander Mitchell
Orientador – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
UFPR



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



Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza
Departamento de Engenharia Química, UFPR

Curitiba, 20 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo apoio e ajuda durante todas as etapas da minha vida.

Ao meu orientador David Alexander Mitchell pelas inúmeras reuniões e horas de discussão. Sua ajuda e conhecimento tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Luciano Fernandes Huergo. Seu conhecimento com relação às proteínas da família PII foi essencial nos momentos de dúvida.

A professora Fernanda de Castilhos e ao doutorando Thiago Weschenfelder do departamento de engenharia química da UFPR por toda ajuda com programação FORTRAN e implantação do algoritmo estocástico.

Aos colegas de laboratório, em especial ao doutorando Wellington Balmant, pela ajuda com alguns programas de computador e por todas boas ideias.

Ao departamento de bioquímica e aos colegas de mestrado e doutorado da UFPR que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A todos meus amigos e amigas que sempre me apoiam quando eu preciso.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Por fim, a todos que se interessarem e lerem este trabalho.

RESUMO

As proteínas PII são importantes reguladoras do metabolismo de nitrogênio em uma grande variedade de microrganismos. Tanto a estrutura tridimensional quanto a presença de sítios de ligação para os efetores ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) são altamente conservadas na família das proteínas PII. Neste trabalho, a ligação de efetores alostéricos à GlnB de *Escherichia coli* foi modelada, considerando pela primeira vez a ligação simultânea de ATP, ADP e 2-OG. Diferentes modelos com relação às mudanças de afinidade durante ligações subsequentes dos nucleotídeos a um mesmo trímero foram construídos e comparados. O modelo escolhido foi capaz de prever, de maneira precisa, a ligação de efetores à GlnB. Este modelo assume que a ligação da primeira molécula de nucleotídeo à PII causa uma mudança de conformação na proteína, fazendo com que a ligação subsequente de nucleotídeos à PII seja dificultada, além de assumir que ATP e ADP podem se ligar a diferentes subunidades do mesmo trímero. O modelo também incorpora a hipótese de que o 2-OG só pode se ligar à PII depois da ligação de ATP. Em proteobactérias, as proteínas PII também podem sofrer uridililação através da ação da UTase, que é regulada pela concentração de glutamina. Para medir a uridililação de PII e estudar como isto afeta os estados de PII no que diz respeito à combinação de efetores ligados a ela, foi utilizada uma constante de pseudo-equilíbrio, K_U , que correlaciona o balanço entres os processos de uridililação e desuridililação de PII e a concentração de glutamina. Através do K_U , foi possível prever a influência exercida pela glutamina nos estados de GlnB. Além disso, já foi sugerido que as PII podem agir como sensores não só da concentração de 2-OG, mas também da razão ATP/ADP. As simulações indicam que as PII podem, de fato, agir como sensores de 2-OG e da razão ATP/ADP e que o modelo pode ser usado para investigar os efeitos de concentrações fisiológicas de ATP, ADP, 2-OG e glutamina nas concentrações dos estados de GlnB que interagem com ATase e NtrB. Em suma, o modelo pode ser usado para simular como esta parte do metabolismo reage de acordo com variações das condições celulares e, portanto, poderá ser usado como uma ferramenta para estudos futuros relativos aos estados de PII e sua interação com proteínas alvo.

Palavras-chave: PII. GlnB. Efetores alostéricos. Uridililação. Modelagem. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

PII proteins are important regulators of nitrogen metabolism in a wide variety of organisms. Both the three dimensional structure and the presence of binding sites for the allosteric effectors ATP, ADP, and 2-oxoglutarate (2-OG) are highly conserved within the PII protein family. The present work represents the first time that the simultaneous binding of ATP, ADP and 2-OG to *Escherichia coli* GlnB has been modeled. Four different models were compared: these models incorporate different assumptions about the affinities with which subsequent effector molecules bind to GlnB. The chosen model was capable of predicting accurately most results of binding of effectors to GlnB. This model assumes that the binding of the first nucleotide to PII alters the protein conformation, making it harder for subsequent nucleotides to bind to PII and that ATP and ADP can bind to the same PII trimer. It also incorporates the hypothesis that 2-OG can only bind to PII after the binding of ATP. The model was also extended to describe uridylylation of PII. In proteobacteria, PII proteins are uridylylated by UTase, with this activity being regulated by the concentration of glutamine. To study how uridylylation of PII affects the relative proportions of the various states, a pseudo-equilibrium constant, K_U , was used to correlate the ratio between the processes of uridylylation and deuridylylation with variations in glutamine concentration. Through the use of K_U , it was possible to predict the influence of glutamine concentration on the states of GlnB. Furthermore, simulations with the model support suggestions made in previously published studies that PII are sensors of both 2-OG and the ATP/ADP ratio. The model was used to investigate the effects of physiological concentrations of ATP, ADP, 2-OG and glutamine on the concentrations of GlnB states that interact with ATase and NtrB. In conclusion, the model can be used to simulate how this part of the metabolism reacts under different physiological states. The model developed in the current work will be a useful tool in future studies concerning PII states and its interaction with target proteins.

Key-words: PII. GlnB. Allosteric effectors. Uridylylation. Modeling. *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- MODELO SIMPLIFICADO DA ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIA.....	15
FIGURA 2- LIGAÇÃO DAS MOLÉCULAS EFETORAS À PII	18
FIGURA 3- URIDILILAÇÃO DE GlnB.....	19
FIGURA 4- REGULAÇÃO DA NtrB	21
FIGURA 5- LIGAÇÃO SUCESSIVA DE ATP À PII.....	22
FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE LIGAÇÃO DOS EFETORES À PII	29
FIGURA 7- REPRESENTAÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO EM RELAÇÃO A ATP E ADP PARA OS QUATRO MODELOS	31
FIGURA 8- ESTADOS HIPOTÉTICOS DE PII URIDILILADA.....	37
FIGURA 9- REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE URIDILILAÇÃO DE GlnB.....	39
FIGURA 10- ANÁLISE DE ERRO DE M1 E M3 PARA VALORES EXPERIMENTAIS ACIMA DE 4 μ M	52
FIGURA 11- ANÁLISE DE ERRO DE M1 E M3 PARA VALORES EXPERIMENTAIS ABAIXO DE 4 μ M.....	53
FIGURA 12- COMPARAÇÃO ENTRE M3 E DADOS EXPERIMENTAIS DE JIANG E NINFA (2007) PARTE 1	54
FIGURA 13- COMPARAÇÃO ENTRE AS PREVISÕES DE M3 E DADOS EXPERIMENTAIS DE JIANG E NINFA (2007) PARTE 2	55
FIGURA 14- SIMULAÇÃO DE ATP OU ADP LIGADO EM FUNÇÃO DO TOTAL DE ATP OU ADP EM DIFERENTES CONDIÇÕES USANDO M3.....	57
FIGURA 15- FRAÇÕES DAS POPULAÇÕES DE GlnB COM QUANTIAS DIFERENTES DE 2-OG LIGADO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ATP	59
FIGURA 16- ESTADOS GlnB-G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE “ATP+ADP” E DA RAZÃO ATP/ADP.....	60
FIGURA 17- EFEITO DA RAZÃO ATP/ADP NAS PROPORÇÕES DOS ESTADOS GlnB-G EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2-OG.....	61

FIGURA 18- FRAÇÕES DOS ESTADOS GlnB-D ₁₋₃ E GlnB-D ₃ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ADP E 2-OG EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ATP	62
FIGURA 19- ESTADOS GlnB-D ₁₋₃ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE “ATP+ADP” TOTAL E DA RAZÃO ATP/ADP	63
FIGURA 20- EFEITO DA RAZÃO ATP/ADP NA PROPORÇÃO DE ESTADOS GlnB-D ₁₋₃ TRAÇADO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2-OG	64
FIGURA 21- EFEITO DA RAZÃO ATP/ADP NA PROPORÇÃO DE ESTADOS GlnB-AT TRAÇADO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2-OG	65
FIGURA 22- RELAÇÃO ENTRE GLUTAMINA E K_U	67
FIGURA 23- VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE EFETORES LIGADOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA	68
FIGURA 24- EFEITO DA RAZÃO ATP/ADP NA PROPORÇÃO DE ESTADOS GlnB-AT TRAÇADO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2-OG CONSIDERANDO URIDILILAÇÃO	69
FIGURA 25- VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE ESTADOS URIDILILADOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA	70
FIGURA 26- EFEITO DA VARIAÇÃO DA RAZÃO ATP/ADP E DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA NO NÍVEL DE URIDILILAÇÃO DE GlnB	71
FIGURA 27- EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OG E DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA NO NÍVEL DE URIDILILAÇÃO DE GlnB.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- PROTEÍNAS PII EM DIFERENTES ORGANISMOS.....	16
TABELA 2- EXPRESSÕES PARA AS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO NOS DIVERSOS MODELOS NO ESTADO ESTACIONÁRIO	32
TABELA 3- EXPRESSÕES PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS DIVERSOS ESTADOS DE GlnB NO ESTADO ESTACIONÁRIO	35
TABELA 4- DADOS EXTRAÍDOS DO TRABALHO DE JIANG E NINFA (2007).....	41
TABELA 5- VALORES DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO AJUSTADAS E ERRO RELATIVO DOS MODELOS	48
TABELA 6- COMPARAÇÃO DOS ERROS RELATIVOS PARA OS QUATRO MODELOS	50
TABELA 7- RELAÇÃO ENTRE K_U E GLUTAMINA EM FUNÇÃO DO NÍVEL DE URIDILAÇÃO DE GlnB NO EQUILÍBRIO.....	66
TABELA 8- VALORES DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO APARENTES DE ATP EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OG.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP - adenosina monofosfato
AmtB - proteína transportadora de amônio
AT - atividade adenililtransferase
ATase - glutamina sintetase adenililtransferase
AR - atividade removedora de adenilil
GDH - glutamato desidrogenase
GOGAT - glutamato sintase
GS - glutamina sintetase
 K_d - constante de dissociação
UMP - uridina monofosfato
UT - atividade uridililtransferase
UTase - uridililtransferase
UR - atividade de remoção de uridilil
2-OG - 2-oxoglutarato
SS - soma dos quadrados
[*T*] - concentração de ATP
[*D*] - concentração de ADP
[*G*] - concentração de 2-OG
[*P*] - concentração de proteína
Subscrito T - total
Subscrito B - ligado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 LIGAÇÃO DOS EFETORES À GlnB.....	17
2.2 URIDILILAÇÃO DE GlnB	18
2.3 INTERAÇÕES ENTRE GlnB E SEUS RECEPTORES.....	19
2.3.1 Interação entre GlnB e ATase	20
2.3.2 Interação entre GlnB e NtrB	20
2.4 MODELOS MATEMÁTICOS PRÉVIOS PARA PII.....	21
2.4.1 Modelo de Jiang e Ninfa (2007)	22
2.4.2 Modelo de Bruggeman, Boogerd e Westerhoff (2005)	25
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	27
4 DESENVOLVIMENTO DO MODELO	28
4.1 ESTRUTURA DO MODELO	28
4.2 EQUAÇÕES PARA EFETORES LIGADOS.....	33
4.3 EQUAÇÕES PARA URIDILILAÇÃO	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1 OBTENÇÃO DE DADOS	40
5.2 DIVISÃO DOS DADOS EM CONJUNTOS DE OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO.....	40
5.3 MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO.....	43
5.4 CÁLCULO DO ERRO RELATIVO TOTAL	44
5.5 EXPLORAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ESTADOS DE PII	44
5.6 CÁLCULO DA RELAÇÃO ENTRE GLUTAMINA E K_U	45
6 RESULTADOS	47
6.1 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS E SELEÇÃO DO MODELO.....	47
6.2 PREDIÇÃO DE EFETORES LIGADOS À GlnB.....	55
6.3 PREDIÇÕES DOS ESTADOS CONFORMACIONAIS DE GlnB E REGULAÇÃO DA ATASE.....	57
6.3.1 Fração de GlnB com uma única molécula de 2-OG ligada	58
6.3.2 Fração de GlnB com pelo menos uma molécula de ADP ligada.....	61

6.3.3 Soma das frações GlnB-G e GlnB-D ₁₋₃	64
6.4 URIDILAÇÃO	65
6.4.1 Relação entre glutamina e K_U	65
6.4.2 Predições dos estados conformacionais de GlnB incluindo uridililação	67
7 DISCUSSÃO	73
7.1 COMPARAÇÃO DO MODELO M3 COM A ABORDAGEM DE MODELAGEM DE JIANG E NINFA (2007)	73
7.2 CONTRIBUIÇÕES DO MODELO M3 PARA INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE SINALIZAÇÃO DE PII.....	77
7.3 PERSPECTIVAS COM RELAÇÃO ÀS PII	79
8 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE	89

1 INTRODUÇÃO

As proteínas PII desempenham importante papel como reguladoras do metabolismo de nitrogênio em uma grande variedade de organismos, incluindo arqueias, bactérias, algas vermelhas e plantas. As PII são homotrímeros com uma massa de cerca de 12 kDa por subunidade. Tanto a estrutura tridimensional quanto a presença de sítios de ligação para os efetores alostéricos ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) são altamente conservadas na família das proteínas PII (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2012).

Todas as proteínas PII estudadas até hoje apresentam três sítios de ligação de nucleotídeos, localizados nas fendas laterais entre os monômeros, nos quais ATP e ADP competem para se ligar (XU *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2001; CONROY *et al.*, 2007; JIANG; NINFA, 2009). Além disso, até três moléculas de 2-OG podem se ligar a uma proteína PII, na vizinhança dos sítios de ligação de ATP. A ligação de 2-OG ocorre cooperativamente com a ligação de ATP e requer a presença de Mg^{2+} (JIANG; NINFA, 2007; FOKINA *et al.*, 2010a; TRUAN *et al.*, 2010; GERHARDT *et al.*, 2011; MAIER *et al.*, 2011).

As proteínas PII podem exibir uma variedade de diferentes combinações de efetores ligados, dependendo das concentrações intracelulares de ATP, ADP e 2-OG. Além disto, em proteobactérias, as proteínas PII podem sofrer modificação covalente através de uridililação (FORCHHAMMER, 2008). A uridililação é reversível e controlada pela enzima bifuncional uridililtransferase (UTase), sendo regulada através da concentração intracelular de glutamina. A combinação dos efetores ligados e o estado de uridililação afetam a estrutura tridimensional das proteínas PII, modulando a capacidade das PII de interagir com suas proteínas alvo (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2012).

Duas proteínas PII são sintetizadas pela *Escherichia coli*, GlnB e GlnK, sendo a proteína GlnB a principal reguladora da assimilação de amônio (ATKINSON; NINFA, 1998; ATKINSON; NINFA, 1999; VAN HEESWIJK *et al.*, 1996; VAN HEESWIJK *et al.*, 2000). Quando a quantidade de glutamina presente na célula é alta, a GlnB interage com a enzima glutamina sintetase adenililtransferase (ATase) e o complexo resultante inativa as subunidades catalíticas da glutamina sintetase (GS) através da adenililação destas subunidades. A GlnB também interage com a

proteína NtrB e o complexo resultante promove a desfosforilação da NtrC, fazendo com que haja uma redução na expressão do gene que codifica GS (JIANG; NINFA, 2007). Já a GlnK é responsável pelo controle do fluxo de amônio através do transportador de amônio AmtB (THOMAS; COUTTS; MERRICK, 2000).

As interações entre GlnB e ATase ou NtrB são influenciadas pela combinação particular dos efetores ligados à GlnB e pelo estado de uridililação da GlnB (JIANG; NINFA, 2007; JIANG; NINFA, 2009). Por este motivo, um modelo matemático capaz de prever a ligação de ATP, ADP e 2-OG à proteína GlnB e seu estado de uridililação seria uma ferramenta muito útil para entender como as concentrações intracelulares de metabólitos afetam as funções de GlnB.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O metabolismo de nitrogênio é essencial para todos os organismos vivos e as células precisam de mecanismos eficientes para se adaptar e sobreviver em função de mudanças nas condições ambientais, como a falta ou escassez de fontes de nitrogênio. Amônia é uma das principais fontes de nitrogênio utilizadas por microorganismos e, no caso de *E. coli*, a assimilação de amônia pode ocorrer através de duas vias: a via da glutamato desidrogenase (GDH), que opera quando a concentração de amônia no meio é alta, e o ciclo da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT), que opera em concentrações mais baixas de amônia (FIGURA 1). A via da glutamato desidrogenase converte 2-OG em glutamato, que, por sua vez, é o principal distribuidor de nitrogênio da célula (YUAN *et al.*, 2009). Já no ciclo GS/GOGAT, a amônia é assimilada através da produção de glutamina, para depois ser convertida em glutamato pela conversão de uma molécula de glutamina e uma de 2-OG em duas moléculas de glutamato.

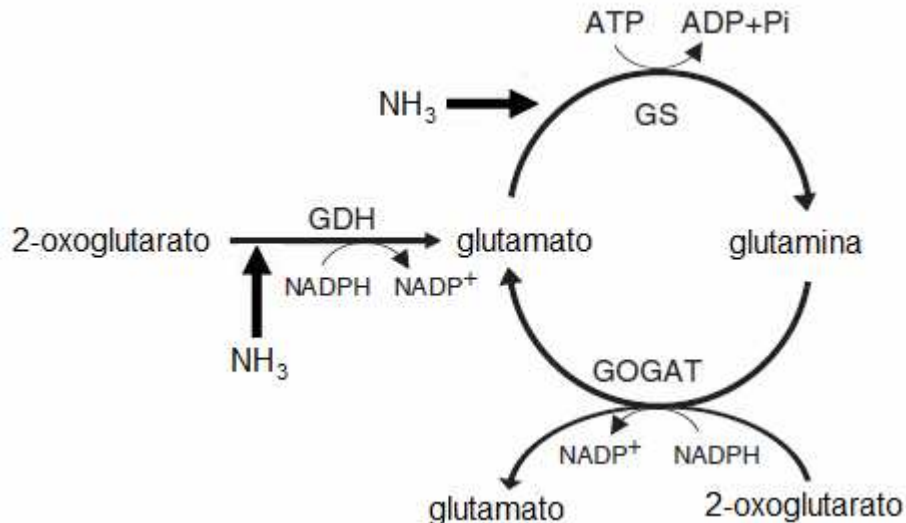


FIGURA 1 - MODELO SIMPLIFICADO DA ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIA. Modelo da assimilação de amônia pela via da glutamato desidrogenase (GDH) e pelo ciclo da glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT). FONTE: YUAN *et al.* (2009)

A GlnB entra neste sistema como reguladora da atividade de GS em *E. coli*, além de controlar a expressão de GS (ambas atividades reguladoras são controladas indiretamente por GlnB). Por sua vez, GlnB é regulada pela ligação de efetores alostéricos ou através de sua uridililação. Também já foi observado *in vitro* que as proteínas PII dos tipos GlnB e GlnK são capazes de agir como sensores da

razão entre ATP e ADP celular, detectando a disponibilidade de ATP para processos anabólicos e para assimilação de nutrientes. Esta capacidade de responder a diferentes sinais é um dos motivos que tornam a elucidação do funcionamento das proteínas PII importante para o entendimento da regulação do metabolismo de nitrogênio.

A importância das proteínas PII não está restrita a *E. coli*. Estas proteínas estão presentes em diversos organismos e elas são responsáveis pela regulação de vários processos ligados ao metabolismo de nitrogênio; alguns exemplos seguem na Tabela 1.

TABELA 1 - PROTEÍNAS PII EM DIFERENTES ORGANISMOS

Organismo	Tipo de PII	Moléculas alvo de PII	Referência
<i>Anabaena variabilis</i>	PII	PipX	Zhao <i>et al.</i> (2010)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PII	NAGK	Mizuno <i>et al.</i> (2007)
<i>Azospirillum brasilense</i>	GlnB, GlnZ	AmtB, DRAG	Huergo <i>et al.</i> (2006)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	GlnK	AmtB, NifL	Little <i>et al.</i> (2000), Little <i>et al.</i> (2002), Rudnick <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus subtilis</i>	GlnK	AmtB, TnrA	Heinrich <i>et al.</i> (2006)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	GlnK	AmtB, AmtR	Beckers <i>et al.</i> (2005), Strosser <i>et al.</i> (2004)
<i>Escherichia coli</i>	GlnB	ATase, NtrB	Ninfa e Jiang (2005)
<i>Escherichia coli</i>	GlnK	AmtB	Coutts <i>et al.</i> (2002)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GlnK	NifL	He <i>et al.</i> (1998)
<i>Methanococcus marispludis</i>	Nifl	Dinitrogenase	Dodsworth e Leigh (2006)
<i>Methanosarcina mazei</i>	GlnK	GS	Ehlers <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	GlnB, GlnJ	DRAT, NifA	Pawlowski <i>et al.</i> (2003)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	GlnB	NifA	Zhang, Pohlmann e Roberts (2005)
<i>Synechococcus</i>	PII, GlnB	NAGK, PipX	Espinosa <i>et al.</i> (2006), Heinrich <i>et al.</i> (2004)
<i>Synechocystis</i>	PII (GlnB)	NAGK	Heinrich <i>et al.</i> (2004)

FONTE: Adaptado de Leigh e Dodsworth (2007) e Huergo, Chandra e Merrick (2012)

2.1 LIGAÇÃO DOS EFETORES À GlnB

A presença de sítios para os efetores ATP, ADP e 2-oxoglutarato é extremamente conservada nas proteínas da família PII (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2012) (FIGURA 2), de modo que a maioria dos resíduos de aminoácidos que participam nas interações proteína-ligante é idêntico nas PII de diferentes organismos (FOKINA *et al.*, 2010a). Como já dito anteriormente, as proteínas PII apresentam três sítios de ligação de nucleotídeos nos quais ATP e ADP se ligam competitivamente (XU *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2001; CONROY *et al.*, 2007; JIANG; NINFA, 2009) (FIGURA 2). Apesar de estas moléculas competirem pelos mesmos sítios, ainda não existem evidências concretas de que ATP e ADP possam se ligar ao mesmo trímero, mesmo que isto já tenha sido sugerido anteriormente (JIANG; NINFA, 2009). A ligação sequencial de moléculas de ATP em um mesmo trímero de GlnB apresenta cooperatividade negativa (JIANG; NINFA, 2007; FOKINA *et al.*, 2010b; HELFMANN *et al.*, 2010; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010; FOKINA; HERRMANN; FORCHHAMMER, 2011), isto é, após a ligação da primeira molécula, as ligações de moléculas subsequentes ao mesmo trímero se tornam cada vez mais difíceis. Já para a ligação sucessiva de moléculas de ADP à GlnB de *E. coli*, na ausência de ATP, Jiang e Ninf (2007) relataram ausência de cooperatividade, porém, não verificaram se o mesmo comportamento é observado em presença de ATP.

A ligação de 2-OG à GlnB ocorre na vizinhança de uma molécula de ATP que já esteja previamente ligada à GlnB (FOKINA *et al.*, 2010a), ou seja, se três moléculas de ATP estiverem ligadas à GlnB, até três moléculas de 2-OG podem se ligar ao trímero (FIGURA 2). Além disso, a ligação de moléculas subsequentes de 2-OG à GlnB apresenta forte cooperatividade negativa (KAMBEROV; ATKINSON; NINFA, 1995; JIANG; NINFA, 2007). Dados estruturais obtidos em proteínas PII de *Azospirillum brasilense*, *Synechococcus elongatus* e *Achaeoglobus fulgidus* demonstraram que a ligação de 2-OG às PII requer Mg^{2+} ; este íon coordena a ligação entre a molécula de 2-OG e os grupos fosfato do ATP (FOKINA *et al.*, 2010a; TRUEN *et al.*, 2010; MAIER *et al.*, 2011). Contudo, ainda não está elucidado se o ATP deve estar na forma Mg-ATP, ou se o Mg^{2+} pode se ligar ao ATP depois de o

ATP já estar ligado à proteína GlnB. Embora a disponibilidade de Mg^{2+} possa ser um fator limitante, em condições fisiológicas, a concentração deste íon é suficiente para assegurar que uma grande parte de ATP esteja presente na forma de Mg-ATP. O K_d (constante de dissociação) da reação $Mg\text{-ATP} \rightarrow Mg^{2+} + ATP$ é de 0,0603 mM (SUZUKI; POST, 1997). O fato da concentração de Mg^{2+} livre no citoplasma de *E. coli* ser de pelo menos 1 mM (SUTENDRA *et al.*, 2007) indica que pelo menos 94% do ATP está na forma Mg-ATP quando a concentração de “ATP + Mg-ATP” é de 1 mM (APÊNDICE 1). A partir destas considerações, deste ponto em diante, quando escrito “ATP” deve-se entender como “Mg-ATP”.

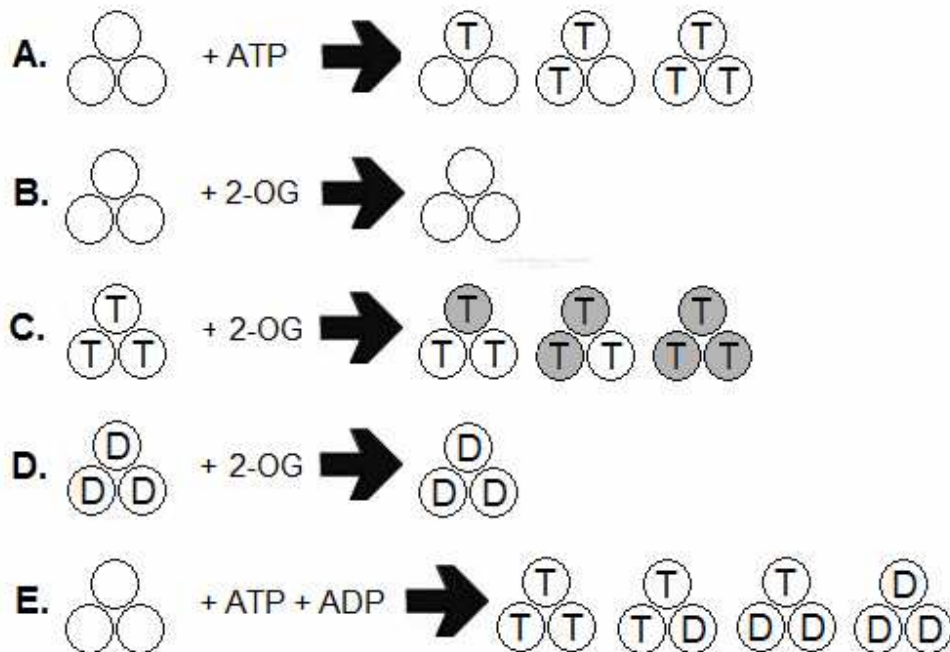


FIGURA 2 - LIGAÇÃO DAS MOLÉCULAS EFETORAS À PII. Símbolos: T, ATP ligado; D, ADP ligado; ●, 2-OG ligado. A) Ligação de ATP às PII; até três moléculas podem se ligar ao trímero. B) Ligação de 2-OG às PII não ocorre em ausência de ATP ligado. C) Ligação de 2-OG em presença de concentrações saturantes de ATP; até três moléculas de 2-OG podem se ligar. D) Ligação de 2-OG não ocorre em subunidades com ADP ligado. E) Competição entre ATP e ADP pelos mesmos sítios (somente estados com saturação dos três sítios são mostrados, porém as subunidades onde ADP e ATP estão ligados poderiam estar vazias). FONTE: O autor (2013)

2.2 URIDILILAÇÃO DE GlnB

Além de poderem ligar ATP, ADP e 2-OG, as proteínas PII de proteobactérias podem sofrer uridililação reversível, sendo possível a incorporação de até três

radicais uridilil (UMP) na mesma proteína, uma em cada monômero (JIANG; NINFA, 2011). A uridililação reversível é catalisada pela enzima UTase, que apresenta sítios de UMP transferase (UT) e remoção de UMP (UR), localizados em diferentes domínios (ZHANG *et al.*, 2010). Glutamina é o efetor alostérico responsável pelo controle das atividades UT e UR da UTase, de modo que a ligação de glutamina à UTase estimula a atividade UR e, em sua ausência, a atividade UT predomina (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2012).

Para que a uridililação de uma subunidade possa ocorrer, é necessária a presença de ATP, Mg^{2+} e 2-OG (JIANG; PELISKA; NINFA, 1998), isto indica que, possivelmente, a uridililação só pode ocorrer em uma subunidade que apresente 2-OG ligado (NINFA; ATKINSON, 2000). Se este for o caso, para que a GlnB possa ter suas três subunidades covalentemente modificadas, é necessário que hajam três moléculas de 2-OG ligadas (FIGURA 3).

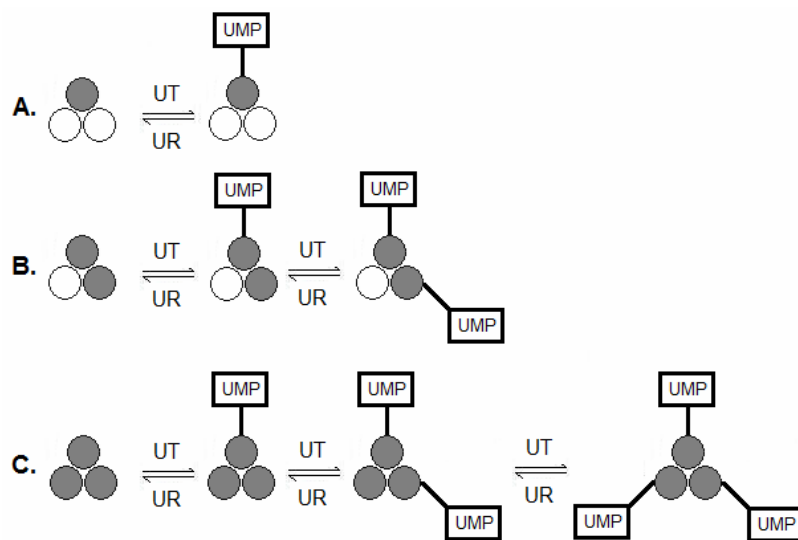


FIGURA 3 - URIDILILAÇÃO DE GlnB. Símbolos: ●, 2-OG ligado; UMP, uridina monofosfato; UT, atividade uridililtransferase; UR, atividade de remoção de uridilil. A) Ligação de UMP à GlnB com uma única molécula de 2-OG ligada. B) Ligação de UMP à GlnB com duas moléculas de 2-OG ligadas. C) Ligação de UMP à GlnB com três moléculas de 2-OG ligadas. FONTE: O autor (2013)

2.3 INTERAÇÕES ENTRE GlnB E SEUS RECEPTORES

As diferentes combinações de ATP, ADP e 2-OG ligados à GlnB e o estado de uridililação da proteína afetam sua estrutura tridimensional, alterando sua

capacidade de interagir (ou deixar de interagir) com receptores alvo. Em *E. coli*, as proteínas PII do tipo GlnB são responsáveis pela regulação direta da proteína NtrB e da enzima ATase e pela regulação indireta da GS (através da ação da ATase).

2.3.1 Interação entre GlnB e ATase

A ATase é a enzima bifuncional responsável pela adenililação reversível da GS. Sua atividade adenililtransferase (AT) faz com que a GS seja adenilada em GS-AMP, resultando em diminuição da atividade da GS. Já sua atividade removedora de adenilil (AR) é responsável pela conversão de GS-AMP em GS, aumentando a atividade da enzima (JIANG; PIOSZAK; NINFA, 2007). Como a GS é responsável pela assimilação de amônia através da conversão de glutamato em glutamina (FIGURA 1), quando a atividade AT prevalece, a assimilação de amônia por esta via é dificultada. Já quando a atividade AR prevalece, a assimilação de amônia é facilitada.

A GlnB é responsável pela regulação das atividades AT e AR da ATase. A atividade AT é estimulada quando GlnB não está uridililada e apresenta uma única molécula de 2-OG ligada ao trímero ou pelo menos uma molécula de ADP ligada ao trímero (JIANG; NINFA, 2009). Já os estados de GlnB uridililados são responsáveis pela promoção da atividade AR da ATase (JIANG; NINFA, 2011). Quanto maior for a quantidade total de subunidades de PII uridililadas, maior será a promoção da atividade AR (JIANG; NINFA, 2011).

2.3.2 Interação entre GlnB e NtrB

A NtrB é uma histidina quinase que faz parte do sistema de dois componentes NtrB-NtrC que, por sua vez, é responsável pela regulação da expressão dos genes *ntr*. A transcrição destes genes resulta na produção de enzimas e proteínas reguladoras relacionadas à assimilação de nitrogênio como, por exemplo, a

produção da GS e das proteínas NtrB e NtrC (NINFA *et al.*, 2000). Quando GlnB apresenta pelo menos uma molécula de 2-OG ligada, ela pode se complexar com NtrB, fazendo com que a atividade de fosfatase de NtrB seja promovida (JIANG; NINFA, 2009; JIANG; NINFA, 2011) (FIGURA 4). Isto faz com que o fator de transcrição NtrC seja desfosforilado, inativando a transcrição dos genes *ntr* (JIANG; NINFA, 2007; JIANG; NINFA, 2009). Quando a molécula de GlnB apresenta uma ou duas uridililações, ela continua podendo se ligar a NtrB, porém, a forma tri-uridililada de GlnB não se liga a NtrB (JIANG; NINFA, 2011).

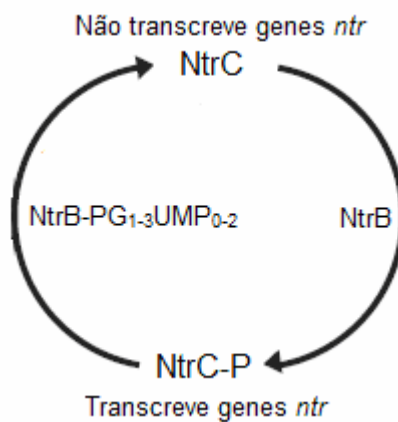


FIGURA 4 - REGULAÇÃO DA NtrB. Símbolo: $PG_{1-3}UMP_{0-2}$, GlnB com pelo menos uma molécula de 2-OG ligada e, no máximo, duas uridililações no mesmo trímero; P, fosfato. Quando GlnB apresenta pelo menos uma molécula de 2-OG ligada, ela se complexa à NtrB, ativando sua atividade de fosfatase, com exceção da forma tri-uridililada que é incapaz de se ligar à GlnB. FONTE: Adaptado de Jiang e Ninfa (2007)

2.4 MODELOS MATEMÁTICOS PRÉVIOS PARA PII

Existem dois modelos matemáticos previamente propostos para GlnB de *E. coli*: o modelo de Jiang e Ninfa (2007), no qual tentou-se modelar a interação entre GlnB e os efetores ATP, ADP e 2-OG, e o modelo de Bruggeman, Boogerd e Westerhoff (2005), no qual tentou-se modelar a interação entre GlnB e 2-OG, a uridililação de GlnB e interação de GlnB com receptores alvo.

2.4.1 Modelo de Jiang e Ninfa (2007)

Jiang e Ninfa (2007) usaram a seguinte equação para expressar a concentração de efetor (ATP, ADP ou 2-OG) ligado a PII:

$$[X]_B = \frac{[P]_T (K_{X2} K_{X3} [X] + 2K_{X3} [X]^2 + 3[X]^3)}{K_{X1} K_{X2} K_{X3} + K_{X2} K_{X3} [X] + K_{X3} [X]^2 + [X]^3} \quad (1)$$

onde $[X]_B$ é a concentração de efetor ligado, $[P]_T$ é a concentração total de PII e K_{X1} , K_{X2} e K_{X3} são as constantes de dissociação associadas à ligação da primeira, segunda e terceira moléculas de ligantes, respectivamente. Esta é uma equação clássica para a ligação de um efetor a três sítios com afinidades diferentes em uma molécula simétrica (BISSWANGER, 2008).

Jiang e Ninfa (2007) trabalharam considerando três situações: o efetor pode se ligar com uma, duas ou três classes de sítios. Quando o efetor apresenta uma única classe de sítios, todas as moléculas de efetor se ligam à PII com a mesma afinidade, de modo que $K_{X1} = K_{X2} = K_{X3}$ na Eq. (1) (FIGURA 5). Quando o efetor apresenta duas classes de sítios, a primeira molécula se liga à PII com afinidade diferente da segunda molécula ($K_{X1} \neq K_{X2}$), porém a segunda e a terceira ligam com a mesma afinidade ($K_{X2} = K_{X3}$) (FIGURA 5). Com três classes, as afinidades de ligação da primeira, segunda e terceira moléculas do efetor à PII são diferentes (ou seja, $K_{X1} \neq K_{X2} \neq K_{X3}$) (FIGURA 5).

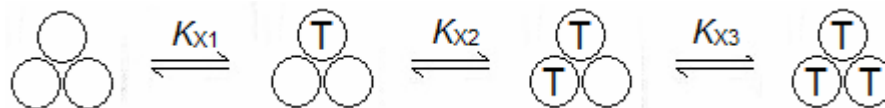


FIGURA 5 - LIGAÇÃO SUCESSIVA DE ATP À PII. Para uma classe de sítios, $K_{X1} = K_{X2} = K_{X3}$. Para duas classes de sítios, $K_{X1} \neq K_{X2} = K_{X3}$. Para três classes de sítios, $K_{X1} \neq K_{X2} \neq K_{X3}$. FONTE: O autor (2013)

Para determinar se um modelo com uma, duas ou três classes de sítios de ligação seria melhor, Jiang e Ninfa (2007) realizaram três tipos de experimentos: experimentos com um único efetor, experimentos com dois efetores e experimentos com os três efetores.

Nos experimentos com apenas um efetor, eles verificaram a ligação de ATP ou ADP à GlnB na ausência dos demais efetores. No experimento com ATP, sua concentração foi variada de 0 a 1000 μM em uma concentração fixa de GlnB de 27,4 μM . Neste experimento, eles traçaram a concentração de ATP ligado em função da concentração de ATP livre e ajustaram os dados da curva resultante à Eq. (1). Usando três classes de sítios, os autores chegaram às estimativas de $K_{X1} = 50 \mu\text{M}$, $K_{X2} = 250 \mu\text{M}$ e $K_{X3} = 520 \mu\text{M}$. Para duas classes de sítios, chegaram às estimativas de $K_{X1} = 42 \mu\text{M}$ e $K_{X2} = K_{X3} = 420 \mu\text{M}$. Para uma única classe de sítios, eles sequer reportaram o valor de K , devido ao péssimo ajuste aos dados experimentais.

Jiang e Ninfa (2007) relataram que o modelo com três classes de sítios se ajustou melhor aos dados experimentais para ligação de ATP, mas que o modelo com duas classes de sítios também teve um ajuste aceitável aos dados experimentais (entretanto, não reportaram nenhum dado estatístico ou matemático para que fosse possível verificar a diferença entre os dois ajustes). O melhor ajuste do modelo com três classes de sítios é esperado, pois um maior número de parâmetros proporciona uma flexibilidade maior à equação.

Para a ligação de ADP como único efetor, Jiang e Ninfa (2007) variaram a concentração de ADP de 0 a 15 μM . A concentração de ADP ligado foi traçada em função da concentração de ADP total. A ligação de ADP à GlnB teve um bom ajuste considerando-se uma única classe de sítios de ligação para ADP, para dois experimentos feitos em duplicata. Os valores de K obtidos nestes experimentos foram de 38 e 32 μM . O fato que uma única classes de sítios para ligação de ADP gerou um bom ajuste sugere que não ocorre cooperatividade para a ligação de ADP à GlnB de *E. coli*. Entretanto, esta análise de Jiang e Ninfa (2007) é insatisfatória, uma vez que o gráfico apresentado pelos autores com relação a estes resultados apresenta inconsistências. Em valores baixos de ADP, os valores de ADP total representados no gráfico possuem valores menores que os de ADP ligado. Não é possível concluir se isto foi erro experimental ou erro na legenda do gráfico (ou seja, ao invés de ADP total seria ADP livre).

A partir destes resultados, Jiang e Ninfa (2007) concluíram, para GlnB de *E. coli*, que a ligação de ATP à GlnB apresenta cooperatividade negativa e a ligação de ADP à GlnB não apresenta cooperatividade.

Nos experimentos com dois efetores, Jiang e Ninfa (2007) procuraram determinar os valores de K_x através da variação na concentração de um efector em presença de outro efector mantido em concentração constante. Foram realizados experimentos com concentrações de ATP diferentes e a mesma concentração de 2-OG e experimentos com a mesma concentração de ATP e concentrações diferentes de 2-OG. Também foram feitos experimentos nos quais os autores mediram a concentração de ATP ligado por trímero enquanto mantinham a concentração de ATP constante e variavam a concentração de ADP. Entretanto, neste último experimento eles não estimaram os valores das constantes de dissociação.

Nos experimentos em que a concentração de 2-OG foi mantida fixa e a concentração de ATP foi variada, somente a forma de Eq. (1) que considera três classes de sítios de ligação para ATP se ajustou bem aos dados experimentais. Em um dos experimentos, no qual a concentração de ATP foi variada de 0 a aproximadamente 350 μM e as concentrações de GlnB e 2-OG foram de 9,75 μM e 50 μM , respectivamente, os autores chegaram em valores de $K_{x1} = 5 \mu\text{M}$, $K_{x2} = 35 \mu\text{M}$ e $K_{x3} = 1000 \mu\text{M}$ para ligação de ATP. Em outro experimento, no qual a concentração de ATP foi variada de 0 a cerca de 50 μM e as concentrações de GlnB e 2-OG foram de 2 μM e 2000 μM , respectivamente, os autores chegaram em valores de $K_{x1} = 0,36 \mu\text{M}$, $K_{x2} = 30 \mu\text{M}$ e $K_{x3} = 300 \mu\text{M}$. Com base nestes dados, os autores chegaram à conclusão de que a presença de 2-OG diminui os valores de K_d para ligação de ATP, ou seja, que a presença de 2-OG facilitaria a ligação de ATP à GlnB. Entretanto, esta conclusão é duvidosa, uma vez que, quando ambos ATP e 2-OG estão presentes, as constantes na Eq. (1) são somente constantes aparentes, ou seja, o valor obtido para a constante de dissociação de ATP depende da concentração de 2-OG usada.

Nos experimentos em que a concentração de ATP foi mantida constante e a concentração de 2-OG foi variada, só foi possível o ajuste adequado usando a Eq. (1) quando foram consideradas três classes de sítios para a ligação de 2-OG. Nestes experimentos, Jiang e Ninfa (2007) usaram concentrações de 2-OG variando de 0 a 600 μM , uma concentração fixa de ATP de 4 mM e uma concentração de GlnB de 30 μM . Isto levou os autores a valores de $K_{x1} = 12 \mu\text{M}$, $K_{x2} = 120 \mu\text{M}$ e $K_{x3} = 5000 \mu\text{M}$ para a ligação de 2-OG e eles chegaram à conclusão de que a ligação subsequente de 2-OG apresenta forte cooperatividade negativa.

Nos experimentos em que a concentração de ATP foi mantida constante e a concentração de ADP variada, Jiang e Ninfa (2007) não realizaram uma análise completa para determinar os valores dos K_d 's para a ligação de ADP, mas mostraram que ADP inibe a ligação de ATP de maneira competitiva. Isto foi verificado através da medição da concentração de ATP ligado: quanto maior a concentração de ADP, menor a concentração de ATP ligado à GlnB.

Nos experimentos realizados em presença simultânea dos três efetores, também não foi realizada uma análise completa para determinar os K_d 's. Em concentrações de ATP e ADP constantes, a concentração de ATP ligado aumentou na presença de maiores concentrações de 2-OG. Em outro conjunto de experimentos no qual a concentração de ADP foi mantida constante e as concentrações de ATP e 2-OG foram variadas, concentrações crescentes de ATP ou 2-OG (na presença de ATP) reduziram a concentração de ADP ligado à GlnB.

2.4.2 Modelo de Bruggeman, Boogerd e Westerhoff (2005)

Bruggeman, Boogerd e Westerhoff (2005) construíram um modelo cinético que engloba múltiplos mecanismos responsáveis pela assimilação de amônia em *E. coli*, incluindo a interação de GlnB com UTase e ATase. Neste modelo, os autores consideraram que GlnB está sempre saturada por ATP no ambiente celular e que os únicos estados de GlnB que apresentariam papel fisiológico de interesse (ou seja, que iriam interagir com ATase) seriam os estados PT_3G (PII com três moléculas de ATP ligadas e uma molécula de 2-OG ligada) e $PT_3G_3UMP_3$ (PII com três moléculas de ATP ligadas, três moléculas de 2-OG ligadas e três subunidades uridililadas). Para calcular as concentrações destes estados, os autores utilizaram equações baseadas no cálculo da concentração de estados específicos, ao invés do cálculo de efetor ligado:

$$[PT_3G] = \frac{3[P]_T[G]}{1 + \frac{3[G]}{K_{G1}} + \frac{3[G]^2}{K_{G1}K_{G2}} + \frac{[G]^3}{K_{G1}K_{G2}K_{G3}}} \quad (2)$$

$$[PT_3G_3UMP_3] = \frac{\frac{[P_TUMP_3][G]^3}{K_{GU1}K_{GU2}K_{GU3}}}{1 + \frac{3[G]}{K_{GU1}} + \frac{3[G]^2}{K_{GU1}K_{GU2}} + \frac{[G]^3}{K_{GU1}K_{GU2}K_{GU3}}} \quad (3)$$

onde $[P]_T$ é a soma da concentração de todos os estados da proteína desuridilada, $[P_TUMP_3]$ é a soma da concentração de todos os estados da proteína triuridilada, K_{G1} , K_{G2} e K_{G3} são as constantes de dissociação para ligação da primeira, segunda e terceira moléculas de 2-OG à GlnB desuridilada, respectivamente, e K_{GU1} , K_{GU2} e K_{GU3} são as constantes de dissociação para ligação da primeira, segunda e terceira moléculas de 2-OG à GlnB triuridilada, respectivamente. Eles utilizaram os seguintes valores para as constantes de dissociação: $K_{G1} = 5 \mu\text{M}$, $K_{G2} = 150 \mu\text{M}$, $K_{G3} = 150 \mu\text{M}$, $K_{GU1} = 25 \mu\text{M}$, $K_{GU2} = 150 \mu\text{M}$ e $K_{GU3} = 150 \mu\text{M}$. Eles citaram Jiang, Peliska e Ninfa (1998) como a fonte destes valores, mas este artigo não apresenta nenhum valor calculado para estas constantes de dissociação.

Como este modelo foi criado em 2005, ele não leva em conta duas descobertas recentes com relação à proteína GlnB. Em primeiro lugar, segundo os resultados de Jiang e Ninfa (2007) e Jiang e Ninfa (2011), os estados PT_3G e $PT_3G_3UMP_3$ definitivamente não são os únicos estados que interagem com ATase. Em segundo lugar, este modelo não considera que o ADP se liga competitivamente com ATP à GlnB.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Nenhum dos modelos apresentados possui a flexibilidade de descrever os estados de GlnB quando ATP, ADP e 2-OG estão presentes simultaneamente. O modelo de Jiang e Ninfa (2007) envolve a aplicação de uma equação para a ligação de um único efetor para três diferentes conjuntos distintos de dados: ATP como único efetor presente, ADP como o único efetor presente e ATP e 2-OG presentes como efetores. Para cada conjunto de dados, eles selecionaram a equação que considera o número apropriado de classes de sítios de ligação (ou seja, permitindo diferentes afinidades para a ligação subsequente dos efetores): três classes para ATP, uma classe para ADP e três classes para 2-OG na presença de concentrações saturantes de ATP. Entretanto, como eles consideraram um único efetor em cada caso, suas equações não podem ser utilizadas para prever a ligação competitiva entre ATP e ADP quando ambos estão presentes. O modelo de Bruggeman, Boogerd e Westerhoff (2005) assume que GlnB está sempre saturada por ATP e que a primeira, segunda e terceira moléculas de 2-OG se ligam à GlnB com diferentes afinidades. Este modelo não reconhece que sempre há ADP presente na célula competindo com ATP para se ligar à GlnB. Já que este modelo também não descreve a ligação de ATP, sua aplicação é limitada às situações em que as concentrações de ATP são saturantes.

Portanto, os modelos atuais não podem descrever os estados de GlnB em intervalos de concentrações destes efetores esperados em várias situações fisiológicas, da suficiência de fontes de carbono e nitrogênio até escassez de uma fonte ou de ambas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo para a GlnB de *E. coli* que apresente esta flexibilidade. Este trabalho foi dividido em duas etapas: a primeira sem levar em conta uridililação e a segunda incluindo os estados uridililados. Os dados experimentais obtidos do trabalho de Jiang e Ninfa (2007) foram usados na primeira etapa, tanto para a estimação dos parâmetros do modelo quanto para sua validação. Os dados experimentais do trabalho de Jiang e Ninfa (2011) foram usados na segunda etapa para incluir o processo de uridililação no modelo. O modelo foi aplicado para prever como flutuações de ATP, ADP, 2-OG e glutamina podem alterar a função de GlnB *in vivo*.

4 DESENVOLVIMENTO DO MODELO

4.1 ESTRUTURA DO MODELO

Cada subunidade do trímico de GlnB apresenta um sítio de ligação no qual ocorre competição entre ATP e ADP (JIANG; NINFA, 2007). Se, e somente se, ATP se liga à subunidade, então um sítio de ligação para 2-OG é criado na subunidade na qual o ATP encontra-se ligado (TRUAN *et al.*, 2010; FOKINA *et al.*, 2010a). Foi assumido que 2-OG não pode se ligar a uma subunidade de GlnB que está ocupada por ADP (FOKINA *et al.*, 2010a). Isto leva a um total de 20 possíveis estados de GlnB e 30 reações reversíveis de dissociação (FIGURA 6). Quando no equilíbrio, cada reação de dissociação ($PX_N \rightarrow PX_{N-1} + X$), para um efetor particular X, é caracterizada por uma constante de dissociação, denotada por K_{XN} :

$$K_{XN} = \frac{[X][PX_{N-1}]}{[PX_N]} \quad (4)$$

onde $[X]$ é a concentração do ligante, que pode ser T (no caso de ATP), D (no caso de ADP) ou G (no caso de 2-OG), $[PX_{N-1}]$ é a concentração de GlnB com $N-1$ efetores ligados e $[PX_N]$ é a concentração de GlnB com N efetores ligados. O N em subscrito denota quantos ligantes daquele tipo estão presentes no complexo que dissocia (ou seja, $N = 1, 2$ ou 3).

Jiang e Ninfa (2007) usaram concentrações de aproximadamente 10 mM de Mg^{2+} e concentrações de até 1 mM de ATP. Nestas condições, mais de 99% do ATP estará na forma Mg-ATP, fazendo com que a presença de Mg^{2+} não seja fator limitante da ligação de 2-OG à GlnB (APÊNDICE 1).

Quatro modelos diferentes foram propostos no presente trabalho, pois ainda não existem evidências concretas confirmando ser possível a presença de ambos ATP e ADP ligados ao mesmo trímico de GlnB. Além disso, também não se sabe se a ligação de uma molécula de ATP ou ADP pode afetar as ligações de moléculas subsequentes quando ambos os nucleotídeos estão presentes.

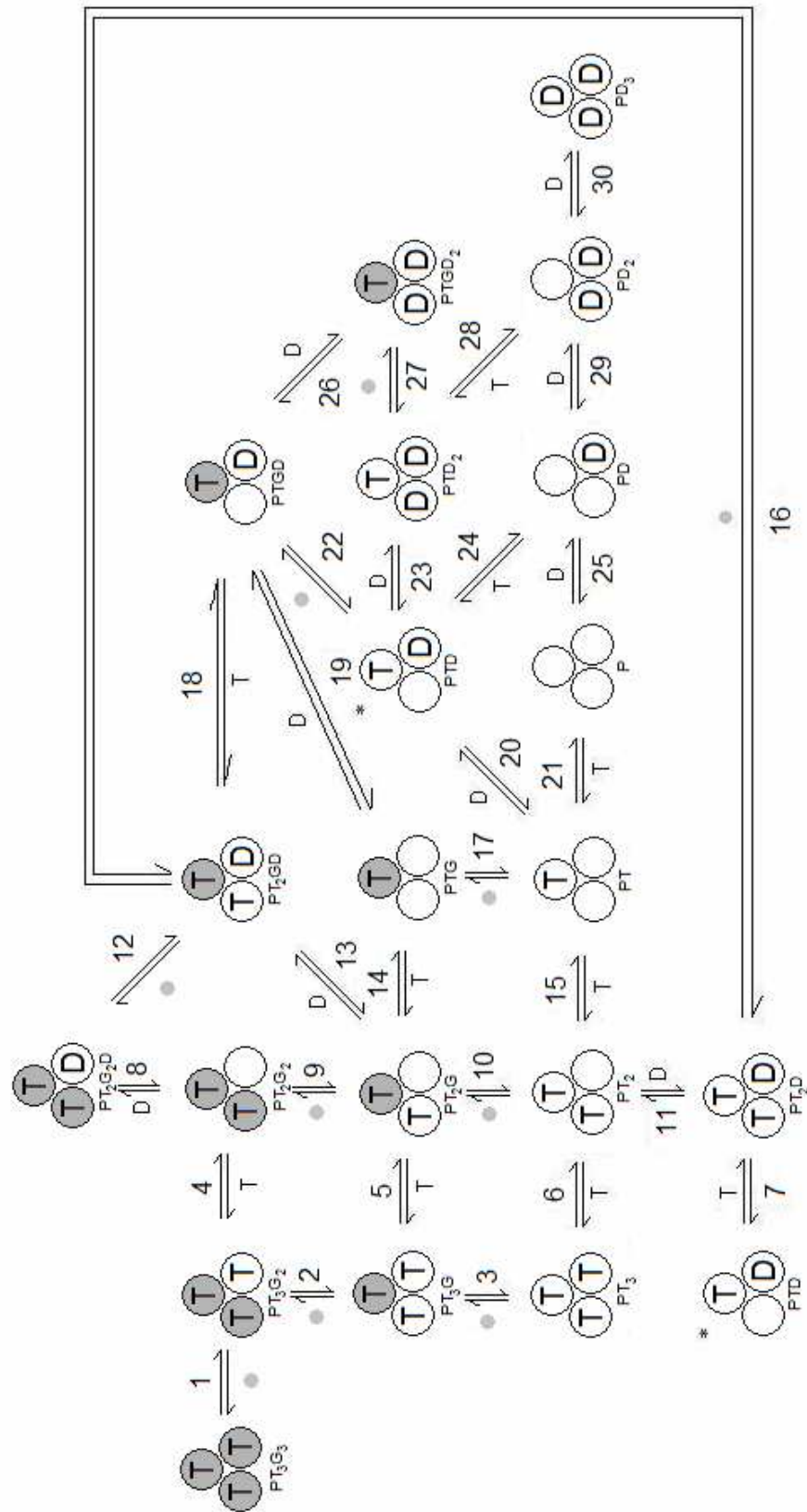


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE LIGAÇÃO DOS EFETORES À PII. Existem um total de 30 reações de dissociação reversíveis e 20 estados possíveis de PII. Símbolos: P, proteína PII; T, ATP; D, ADP; •, 2-OG. O estado com asterisco aparece duas vezes no esquema para evitar cruzamento das setas representando as reações. Os números das reações correspondem aos utilizados na (TABELA 2). FONTE: O autor (2013)

Já que GlnB apresenta forte cooperatividade negativa para ligação de moléculas subsequentes de 2-OG (KAMBEROV; ATKINSON; NINFA, 1995; JIANG; NINFA, 2007), todos quatro modelos apresentam três classes de sítios para a ligação deste efetor (ou seja, $K_{G1} \neq K_{G2} \neq K_{G3}$). Foi assumido que a ligação de 2-OG a uma determinada subunidade não afeta a ligação de ATP ou ADP às subunidades adjacentes. Os modelos diferem em como eles tratam a ligação de moléculas subsequentes de ATP ou ADP conforme mostrado na Figura 7.

O modelo 1 (M1) foi baseado no ajuste realizado por Jiang e Ninfa (2007) e considera três classes de sítios de ligação para ATP (ou seja, $K_{T1} \neq K_{T2} \neq K_{T3}$) e uma única classe de sítios para ADP (ou seja, todas constantes de dissociação são representadas por K_{D1}). Isto significa que a ligação de ADP não afeta a ligação de moléculas subsequentes, tanto de ATP quanto de ADP, e que a ligação de ATP apenas afeta a ligação de moléculas subsequentes de ATP (FIGURA 7). Estes efetores podem se ligar ao mesmo trímero, competindo pelos mesmos sítios de ligação.

O modelo 2 (M2) assume que existem apenas duas classes de sítios, tanto para o ATP quanto para o ADP, e que estes efetores não podem se ligar ao mesmo trímero. Depois da ligação do primeiro ATP ou ADP, as afinidades mudam, de modo que $K_{T1} \neq K_{T2}$ e $K_{D1} \neq K_{D2}$. As ligações do segundo e terceiro ATP ou ADP têm a mesma afinidade, de modo que $K_{T2} = K_{T3}$ e $K_{D2} = K_{D3}$ (FIGURA 7).

O modelo 3 (M3) tem as mesmas considerações que M2, porém permite que ADP e ATP se liguem ao mesmo trímero (FIGURA 7).

O modelo 4 (M4) assume que existem três classes de sítios nos quais ATP e ADP podem se ligar, com estes efetores podendo se ligar ao mesmo trímero. Depois da ligação de cada efetor, a proteína muda sua conformação, de modo que $K_{T1} \neq K_{T2} \neq K_{T3}$ e $K_{D1} \neq K_{D2} \neq K_{D3}$ (FIGURA 7).

Na Tabela 2 estão representadas as expressões para as constantes de dissociação para todas as reações presentes na Figura 6 para os quatro diferentes modelos.

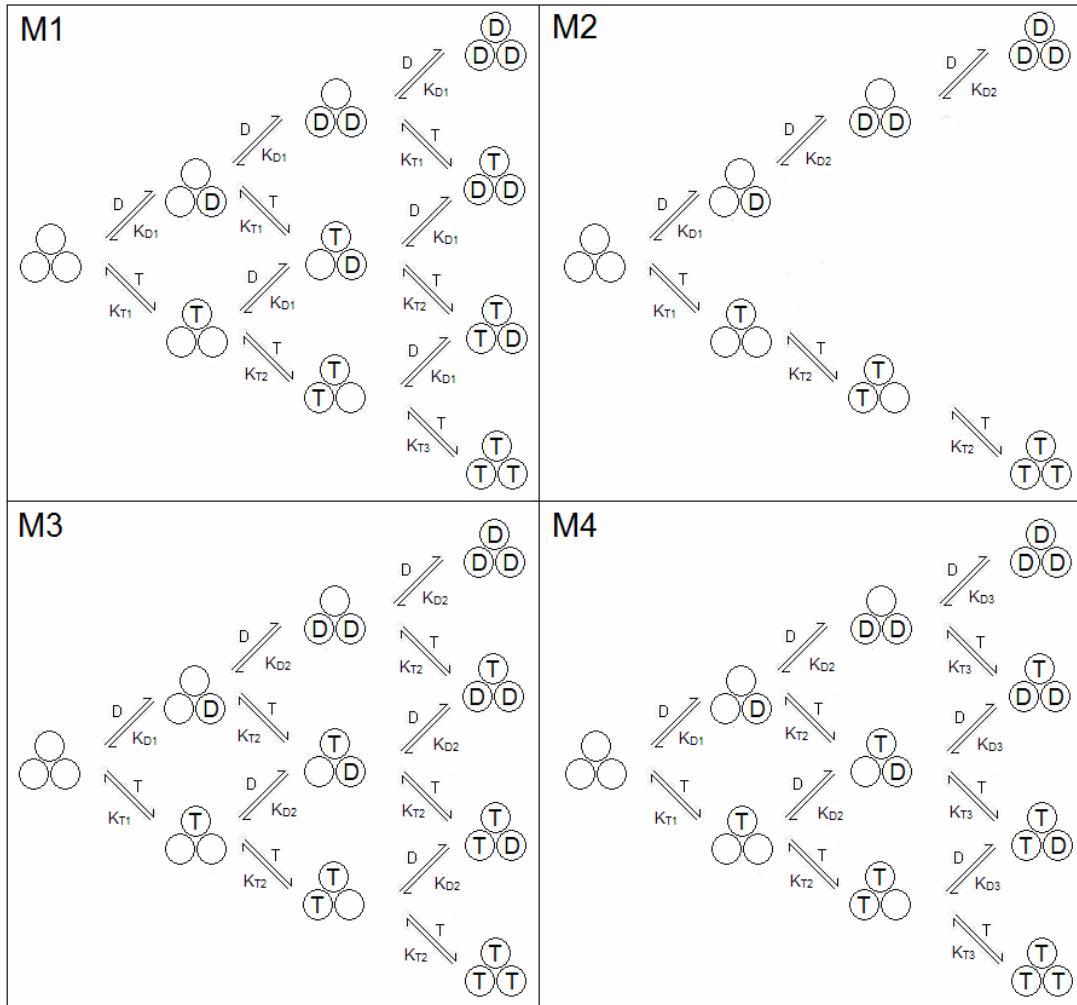


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO EM RELAÇÃO A ATP E ADP PARA OS QUATRO MODELOS. Símbolos: T, ATP; D, ADP. FONTE: O autor (2013)

TABELA 2 - EXPRESSÕES PARA AS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO NOS DIVERSOS MODELOS NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Rxn #	Equação para a constante de Equilíbrio	K M1	K M2	K M3	K M4	Rxn #	Equação de Equilíbrio	K M1	K M2	K M3	K M4
1	$\frac{[PT_3G_2][G]}{[PT_3G_3]}$	K_{G3}	K_{G3}	K_{G3}	K_{G3}	16	$\frac{[PT_2D][G]}{[PT_2GD]}$	K_{G1}	-*	K_{G1}	K_{G1}
2	$\frac{[PT_3G][G]}{[PT_3G_2]}$	K_{G2}	K_{G2}	K_{G2}	K_{G2}	17	$\frac{[PT][G]}{[PTG]}$	K_{G1}	K_{G1}	K_{G1}	K_{G1}
3	$\frac{[PT_3][G]}{[PT_3G]}$	K_{G1}	K_{G1}	K_{G1}	K_{G1}	18	$\frac{[PTGD][T]}{[PT_2GD]}$	K_{T2}	-	K_{T2}	K_{T3}
4	$\frac{[PT_2G_2][T]}{[PT_3G_2]}$	K_{T3}	K_{T2}	K_{T2}	K_{T3}	19	$\frac{[PTG][D]}{[PTGD]}$	K_{D1}	-	K_{D2}	K_{D2}
5	$\frac{[PT_2G][T]}{[PT_3G]}$	K_{T3}	K_{T2}	K_{T2}	K_{T3}	20	$\frac{[PT][D]}{[PTD]}$	K_{D1}	-	K_{D2}	K_{D2}
6	$\frac{[PT_2][T]}{[PT_3]}$	K_{T3}	K_{T2}	K_{T2}	K_{T3}	21	$\frac{[P][T]}{[PT]}$	K_{T1}	K_{T1}	K_{T1}	K_{T1}
7	$\frac{[PTD][T]}{[PT_2D]}$	K_{T2}	-	K_{T2}	K_{T3}	22	$\frac{[PTD][G]}{[PTGD]}$	K_{G1}	-	K_{G1}	K_{G1}
8	$\frac{[PT_2G_2][D]}{[PT_2G_2D]}$	K_{D1}	-	K_{D2}	K_{D3}	23	$\frac{[PTD][D]}{[PTD_2]}$	K_{D1}	-	K_{D2}	K_{D3}
9	$\frac{[PT_2G][G]}{[PT_2G_2]}$	K_{G2}	K_{G2}	K_{G2}	K_{G2}	24	$\frac{[PD][T]}{[PTD]}$	K_{T1}	-	K_{T2}	K_{T2}
10	$\frac{[PT_2][G]}{[PT_2G]}$	K_{G1}	K_{G1}	K_{G1}	K_{G1}	25	$\frac{[P][D]}{[PD]}$	K_{D1}	K_{D1}	K_{D1}	K_{D1}
11	$\frac{[PT_2][D]}{[PT_2D]}$	K_{D1}	-	K_{D2}	K_{D3}	26	$\frac{[PTGD][D]}{[PTGD_2]}$	K_{D1}	-	K_{D2}	K_{D3}
12	$\frac{[PT_2GD][G]}{[PT_2G_2D]}$	K_{G2}	-	K_{G2}	K_{G2}	27	$\frac{[PTD_2][G]}{[PTGD_2]}$	K_{G1}	-	K_{G1}	K_{G1}
13	$\frac{[PT_2G][D]}{[PT_2GD]}$	K_{D1}	-	K_{D2}	K_{D3}	28	$\frac{[PD_2][T]}{[PTD_2]}$	K_{T1}	-	K_{T2}	K_{T3}
14	$\frac{[PTG][T]}{[PT_2G]}$	K_{T2}	K_{T2}	K_{T2}	K_{T2}	29	$\frac{[PD][D]}{[PD_2]}$	K_{D1}	K_{D2}	K_{D2}	K_{D2}
15	$\frac{[PT][T]}{[PT_2]}$	K_{T2}	K_{T2}	K_{T2}	K_{T2}	30	$\frac{[PD_2][D]}{[PD_3]}$	K_{D1}	K_{D2}	K_{D2}	K_{D3}

FONTE: O autor (2013). Símbolos: P, proteína; T, ATP; D, ADP; G, 2-OG; Rxn #, número da reação.

* Quando certa reação não existe (no caso de M2), a constante de dissociação é representada por um traço.

4.2 EQUAÇÕES PARA EFETORES LIGADOS

Para cada modelo, as expressões para cada reação de dissociação são mostradas na Tabela 2. As expressões são equações algébricas não diferenciais por tratarem o sistema no estado estacionário. Cada estado de GlnB é representado pela letra P (simbolizando o trímero de GlnB), seguido pelas letras indicando os efetores ligados (T para ATP, D para ADP e G para 2-OG), com os subscritos indicando o número de efetores por trímero.

A concentração total de GlnB no sistema, representada por $[P]_T$, é igual à soma das concentrações de todos os estados:

$$[P]_T = \left(\begin{aligned} & [P] + [PT] + [PTD] + [PTD_2] + [PTG] + [PTGD] + [PTGD_2] \\ & + [PT_2] + [PT_2D] + [PT_2G] + [PT_2G_2] + [PT_2GD] + [PT_2G_2D] \\ & + [PT_3] + [PT_3G] + [PT_3G_2] + [PT_3G_3] + [PD] + [PD_2] + [PD_3] \end{aligned} \right) \quad (5)$$

As concentrações de ATP ligado, ADP ligado e 2-OG ligado, denotadas por $[T]_B$, $[D]_B$ e $[G]_B$, respectivamente, são dadas pelas seguintes expressões:

$$[T]_B = \left(\begin{aligned} & [PT] + [PTD] + [PTD_2] + [PTG] + [PTGD] + [PTGD_2] \\ & + 2([PT_2] + [PT_2D] + [PT_2G] + [PT_2G_2] + [PT_2GD] + [PT_2G_2D]) \\ & + 3([PT_3] + [PT_3G] + [PT_3G_2] + [PT_3G_3]) \end{aligned} \right) \quad (6a)$$

$$[D]_B = \left(\begin{aligned} & [PD] + [PTD] + [PT_2D] + [PTGD] + [PT_2GD] + [PT_2G_2D] \\ & + 2([PD_2] + [PTD_2] + [PTGD_2]) + 3[PD_3] \end{aligned} \right) \quad (6b)$$

$$[G]_B = \left(\begin{aligned} & [PTG] + [PT_2G] + [PT_3G] + [PTGD] + [PT_2GD] + [PTGD_2] \\ & + 2([PT_2G_2] + [PT_3G_2] + [PT_2G_2D]) + 3[PT_3G_3] \end{aligned} \right) \quad (6c)$$

Para M2, os estados PTD , PT_2D , PTD_2 , $PTGD$, PT_2GD e $PTGD_2$ não existem e, portanto, suas concentrações são iguais à zero.

O número médio de moléculas de ATP, ADP e 2-OG ligadas a cada trîmero de GlnB, denotados por n_{ATP} , n_{ADP} e $n_{2\text{-OG}}$, respectivamente, é dado pelas expressões:

$$n_{\text{ATP}} = \frac{[T]_{\text{B}}}{[P]_{\text{T}}} \quad (7a)$$

$$n_{\text{ADP}} = \frac{[D]_{\text{B}}}{[P]_{\text{T}}} \quad (7b)$$

$$n_{2\text{-OG}} = \frac{[G]_{\text{B}}}{[P]_{\text{T}}} \quad (7c)$$

Todos os estados de GlnB podem ser escritos em função das concentrações de efetores livres (ou seja, $[T]$, $[D]$ ou $[G]$), da concentração de GlnB (ou seja, $[P]$) e das constantes de dissociação. Por exemplo, usando as constantes de dissociação das reações 17 e 21 (FIGURA 6), é possível deduzir equações para as concentrações dos estados PT e PTG :

$$[PT] = \frac{[P][T]}{K_{T1}} \quad (8a)$$

$$[PTG] = \frac{[PT][G]}{K_{G1}} = \frac{\left(\frac{[P][T]}{K_{T1}}\right)[G]}{K_{G1}} = \frac{[P][T][G]}{K_{T1}K_{G1}} \quad (8b)$$

Este procedimento foi repetido para todos os estados de GlnB para cada um dos quatro modelos, resultando nas expressões mostradas na Tabela 3. Para cada modelo, estas expressões são, então, substituídas nas Eqs. (6a) a (6c), que, em sequência, são substituídas nas Eqs. (7a) a (7c). Após este procedimento, todos os termos nas Eqs. (7a) a (7c) contêm $[P]$, de modo que este termo é cancelado. Se as concentrações totais dos ligantes (denotadas por $[T]_{\text{T}}$, $[D]_{\text{T}}$ e $[G]_{\text{T}}$ para ATP, ADP e 2-OG, respectivamente) são conhecidas, é possível substituir os termos $[T]_{\text{B}}$ na

TABELA 3 - EXPRESSÕES PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS DIVERSOS ESTADOS DE GlnB NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Estado	M1	M2	M3	M4
[P]	[P]	[P]	[P]	[P]
[PT]	$\frac{[P][T]}{K_{T1}}$	$\frac{[P][T]}{K_{T1}}$	$\frac{[P][T]}{K_{T1}}$	$\frac{[P][T]}{K_{T1}}$
[PT ₂]	$\frac{[P][T]^2}{K_{T1}K_{T2}}$	$\frac{[P][T]^2}{K_{T1}K_{T2}}$	$\frac{[P][T]^2}{K_{T1}K_{T2}}$	$\frac{[P][T]^2}{K_{T1}K_{T2}}$
[PT ₃]	$\frac{[P][T]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}}$	$\frac{[P][T]^3}{K_{T1}K_{T2}^2}$	$\frac{[P][T]^3}{K_{T1}K_{T2}^2}$	$\frac{[P][T]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}}$
[PD]	$\frac{[P][D]}{K_D}$	$\frac{[P][D]}{K_{D1}}$	$\frac{[P][D]}{K_{D1}}$	$\frac{[P][D]}{K_{D1}}$
[PD ₂]	$\frac{[P][D]^2}{K_D^2}$	$\frac{[P][D]^2}{K_{D1}K_{D2}}$	$\frac{[P][D]^2}{K_{D1}K_{D2}}$	$\frac{[P][D]^2}{K_{D1}K_{D2}}$
[PD ₃]	$\frac{[P][D]^3}{K_D^3}$	$\frac{[P][D]^3}{K_{D1}K_{D2}^2}$	$\frac{[P][D]^3}{K_{D1}K_{D2}^2}$	$\frac{[P][D]^3}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}}$
[PTG]	$\frac{[P][T][G]}{K_{T1}K_{G1}}$	$\frac{[P][T][G]}{K_{T1}K_{G1}}$	$\frac{[P][T][G]}{K_{T1}K_{G1}}$	$\frac{[P][T][G]}{K_{T1}K_{G1}}$
[PT ₂ G]	$\frac{[P][T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}}$	$\frac{[P][T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}}$	$\frac{[P][T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}}$	$\frac{[P][T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}}$
[PT ₃ G]	$\frac{[P][T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}}$	$\frac{[P][T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}^2K_{G1}}$	$\frac{[P][T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}^2K_{G1}}$	$\frac{[P][T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}}$
[PT ₂ G ₂]	$\frac{[P][T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}}$	$\frac{[P][T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}}$	$\frac{[P][T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}}$	$\frac{[P][T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}}$
[PT ₃ G ₂]	$\frac{[P][T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}}$	$\frac{[P][T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}^2K_{G1}K_{G2}}$	$\frac{[P][T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}^2K_{G1}K_{G2}}$	$\frac{[P][T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}}$
[PT ₃ G ₃]	$\frac{[P][T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}}$	$\frac{[P][T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}^2K_{G1}K_{G2}K_{G3}}$	$\frac{[P][T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}^2K_{G1}K_{G2}K_{G3}}$	$\frac{[P][T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}}$
[PTD]	$\frac{[P][T][D]}{K_{T1}K_D}$	-*	$\frac{[P][T][D]}{K_{T1}K_{D2}}$	$\frac{[P][T][D]}{K_{T1}K_{D2}}$
[PT ₂ D]	$\frac{[P][T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_D}$	-	$\frac{[P][T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D2}}$	$\frac{[P][T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D3}}$
[PTD ₂]	$\frac{[P][T][D]^2}{K_{T1}K_D^2}$	-	$\frac{[P][T][D]^2}{K_{T1}K_{D2}^2}$	$\frac{[P][T][D]^2}{K_{T1}K_{D2}K_{D3}}$
[PTGD]	$\frac{[P][T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_D}$	-	$\frac{[P][T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D2}}$	$\frac{[P][T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D2}}$
[PTGD ₂]	$\frac{[P][T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_D^2}$	-	$\frac{[P][T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D2}^2}$	$\frac{[P][T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D2}K_{D3}}$

continua

TABELA 3 - EXPRESSÕES PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS DIVERSOS ESTADOS DE GlnB
continuação e conclusão

Estado	M1	M2	M3	M4
$[PT_2GD]$	$\frac{[P][T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_D}$	-	$\frac{[P][T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D2}}$	$\frac{[P][T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D3}}$
$[PT_2G_2D]$	$\frac{[P][T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_D}$	-	$\frac{[P][T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D2}}$	$\frac{[P][T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D3}}$

FONTE: O autor (2013)

*No caso de M2 alguns estados de GlnB não existem; estes estados estão representados por um traço.

Eq. (7a) por $[T]_T - [T]$, $[D]_B$ na Eq. (7b) por $[D]_T - [D]$ e $[G]_B$ na Eq. (7c) por $[G]_T - [G]$. Após esta etapa, as equações (7a) a (7c) representam três equações não-lineares em função de $[T]$, $[D]$ e $[G]$ (equações completas disponíveis no Apêndice 2).

4.3 EQUAÇÕES PARA URIDILILAÇÃO

A uridililação de um monômero independe do estado de ligação dos outros monômeros do trîmero (JIANG; ZUCKER; NINFA, 1997). Para que ocorra uridililação de GlnB, é necessária a presença de Mg^{2+} , ATP e 2-OG ou ATP e Mn^{2+} (JIANG, PELISKA, NINFA, 1998) e a uridililação só ocorre em uma subunidade capaz de ligar ATP e 2-OG (JIANG; ZUCKER; NINFA, 1997). Para que ocorra desuridililação de GlnB, é necessária a presença de Mg^{2+} , ATP e 2-OG ou, simplesmente, a presença de Mn^{2+} (JIANG, PELISKA, NINFA, 1998). Contudo, segundo Jiang, Peliska e Ninfa 1998, as atividades UT e UR dependentes de Mn^{2+} não possuem relevância fisiológica. Como simplificação do modelo de uridililação, será considerado que o desligamento de ATP e 2-OG de uma subunidade que apresente uridililação não é possível. Sem esta simplificação, a resolução do modelo não seria possível através dos *softwares* utilizados devido ao grande número de estados que seriam possíveis pra GlnB (mais de 90), além disso, não existem evidências claras de que é possível o desligamento de ATP e 2-OG da subunidade uridililada. A partir disto, partiu-se da hipótese de que existam 15 estados distintos possíveis para PII uridililada (FIGURA 8). Somados aos 20 estados sem uridililação (FIGURA 6), isto leva a um total de 35 estados hipotéticos de PII.

Como as atividades UT e UR da UTase dependem da concentração intracelular de glutamina, será considerada que, em uma determinada situação, na qual a concentração de glutamina é mantida constante, a razão entre as atividades UR e UT também permanece constante. Então, para o modelo, a razão entre as formas desuridililadas e uridililadas será dada por uma constante de pseudo-equilíbrio, denotada por K_U , cujo valor dependerá da concentração de glutamina. Ou seja, em uma concentração fixa de glutamina, o valor de K_U é considerado constante além de se considerar que este valor é independente do nível de uridililação da proteína.

$$K_U = \frac{[P]}{[PUMP]} = \frac{[PUMP]}{[PUMP_2]} = \frac{[PUMP_2]}{[PUMP_3]} \quad (9)$$

K_U é a constante de pseudo-equilíbrio de uridililação, $[P]$ é a concentração de GlnB desuridililada, $[PUMP]$ é a concentração de GlnB monouridililada, $[PUMP_2]$ é a concentração de GlnB biuridililada e $[PUMP_3]$ é a concentração de GlnB

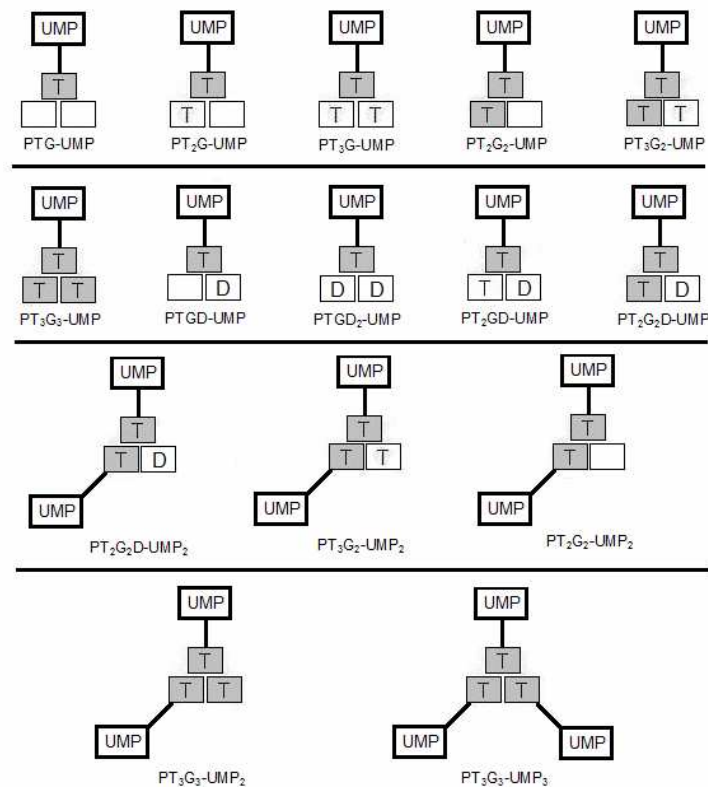


FIGURA 8 - ESTADOS HIPOTÉTICOS DE PII URIDILILADA. Símbolos: P, proteína PII; T, ATP; D, ADP; ●, 2-OG; UMP, uridina monofosfato. FONTE: O autor (2013)

triuridililada. A dedução de expressões para os estados uridililados segue a mesma lógica que as deduções mostradas nas equações (8a) e (8b). Por exemplo:

$$K_U = \frac{[PTG]}{[PTGUMP]} \quad (10a)$$

$$[PTGUMP] = \frac{[PTG]}{K_U} = \frac{[P][T][G]}{K_{T1}K_{G1}K_U} \quad (10b)$$

Este mesmo procedimento foi repetido para os estados de GlnB uridililados (FIGURA 8) e as mesmas etapas de substituições realizadas nas Eqs. (6a) a (6c) e (7a) a (7c) foram feitas. As equações utilizadas, considerando os estados uridililados, estão presentes no Apêndice 3. A Figura 9 mostra o esquema representando as reações de uridililação e desuridililação.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DE DADOS

Os dados experimentais de concentração de efetores livres, ligados e total e de concentração de proteína foram obtidos do trabalho de Jiang e Ninfa (2007): figura 9 (partes A a E) e figura 10 (partes A a D) de seu trabalho, totalizando 61 pontos experimentais. Os dados retirados diretamente dos gráficos foram obtidos utilizando o programa DIGITIZE de Yaron Danon que transforma os pontos nos gráficos em dados numéricos. Devido a inconsistências na figura 9D do trabalho destes autores, onde a concentração de ADP ligado era maior do que a concentração de ADP total nos dados em que a concentração de ADP era baixa, foi assumido que o eixo X da figura dos autores estava com a legenda errada, então considerou-se que os valores do eixo X desta figura indicava valores para concentração de ADP livre, ao invés de concentração de ADP total. Todos os dados obtidos são mostrados na Tabela 4.

5.2 DIVISÃO DOS DADOS EM CONJUNTOS DE OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO

É possível resolver as equações (A2a) a (A2c) (APÊNDICE 2) explicitamente dado, primeiro, estimativas das constantes de dissociação (estas estimativas estando disponíveis durante o procedimento de otimização) e, segundo, as concentrações dos ligantes livres, $[T]$, $[D]$ e $[G]$ (estas concentrações podem ser iguais a zero). Isto simplifica o procedimento de otimização, pois a implementação de um método de resolução de equações não-lineares é evitada. Dos 61 conjuntos de dados extraídos de Jiang e Ninfa (2007), 25 contêm informação completa com relação às concentrações de ligantes livres para todos os efetores. Destes 25, 19 foram usados para a otimização e os outros 6 para uma primeira validação dos

TABELA 4 - DADOS EXTRAÍDOS DO TRABALHO DE JIANG E NINFA (2007)

#	[T] (μM)	[D] (μM)	[G] (μM)	[P] (μM)	[T] _B (μM)	[D] _B (μM)	[G] _B (μM)	[T] _T (μM)	[D] _T (μM)	[G] _T (μM)	Dados experimentais usados para cálculo de erro
CONJUNTO DE DADOS DE OTIMIZAÇÃO											
1	899	0	0	27,4	68	0	0	967*	0	0	[T] _B = 68 μM
2	633	0	0	27,4	61	0	0	694*	0	0	[T] _B = 61 μM
3	161	0	0	27,4	39	0	0	200*	0	0	[T] _B = 39 μM
4	68	0	0	27,4	27	0	0	97*	0	0	[T] _B = 27 μM
5	16	0	0	27,4	8	0	0	24*	0	0	[T] _B = 8 μM
6	7	0	0	27,4	4	0	0	11*	0	0	[T] _B = 4 μM
7	0	471	0	27,4	0	78	0	0	549*	0	[D] _B = 78 μM
8	0	301	0	27,4	0	74	0	0	375*	0	[D] _B = 74 μM
9	0	53	0	27,4	0	42	0	0	95*	0	[D] _B = 42 μM
10	0	25	0	27,4	0	31	0	0	56*	0	[D] _B = 31 μM
11	0	5	0	27,4	0	9	0	0	14*	0	[D] _B = 9 μM
12	0	4	0	27,4	0	5	0	0	9*	0	[D] _B = 5 μM
13	3910**	0	562	30	90**	0	57	4000	0	619*	[G] _B = 57 μM
14	3910**	0	391	30	90**	0	53	4000	0	444*	[G] _B = 53 μM
15	3910**	0	149	30	90**	0	44	4000	0	193*	[G] _B = 44 μM
16	3910**	0	93	30	90**	0	41	4000	0	134*	[G] _B = 41 μM
17	3910**	0	25	30	90**	0	25	4000	0	50*	[G] _B = 25 μM
18	3910**	0	12	30	90**	0	17	4000	0	29*	[G] _B = 17 μM
19	3910**	0	4	30	90**	0	9	4000	0	13*	[G] _B = 9 μM
CONJUNTO DE DADOS DA 1ª VALIDAÇÃO											
20	333	0	0	27,4	48	0	0	381*	0	0	[T] _B = 48 μM
21	35	0	0	27,4	16	0	0	51*	0	0	[T] _B = 16 μM
22	0	122	0	27,4	0	62	0	0	184*	0	[D] _B = 62 μM
23	0	13	0	27,4	0	20	0	0	33*	0	[D] _B = 20 μM
24	3910**	0	244	30	90**	0	48	4000	0	292*	[G] _B = 48 μM
25	3910**	0	54	30	90**	0	35	4000	0	89*	[G] _B = 35 μM
CONJUNTO DE DADOS DA 2ª VALIDAÇÃO											
26	321	0	-***	9,75	21	0	-	342*	0	50	[T] _B = 21 μM
27	172	0	-	9,75	19,5	0	-	191.5*	0	50	[T] _B = 19,5 μM
28	80	0	-	9,75	17,5	0	-	97.5*	0	50	[T] _B = 17,5 μM
29	36	0	-	9,75	14	0	-	50*	0	50	[T] _B = 14 μM
30	15	0	-	9,75	10	0	-	25*	0	50	[T] _B = 10 μM
31	6,5	0	-	9,75	6	0	-	12.5*	0	50	[T] _B = 6 μM

continua

TABELA 4 - DADOS EXTRAÍDOS DO TRABALHO DE JIANG E NINFA (2007)

#	continuação e conclusão										Dados experimentais usados para cálculo de erro
	[T] (μM)	[D] (μM)	[G] (μM)	[P] (μM)	[T] _B (μM)	[D] _B (μM)	[G] _B (μM)	[T] _T (μM)	[D] _T (μM)	[G] _T (μM)	
32	2	0	-	9,75	3,5	0	-	5,5*	0	50	[T] _B = 3,5 μM
33	1	0	-	9,75	2	0	-	3*	0	50	[T] _B = 2 μM
34	41	0	-	2	3,35	0	-	44,35*	0	2000	[T] _B = 3,35 μM
35	28	0	-	2	2,97	0	-	30,97*	0	2000	[T] _B = 2,97 μM
36	16,7	0	-	2	2,75	0	-	19,45*	0	2000	[T] _B = 2,75 μM
37	7,5	0	-	2	2,3	0	-	9,8*	0	2000	[T] _B = 2,3 μM
38	2,8	0	-	2	1,95	0	-	4,75*	0	2000	[T] _B = 1,95 μM
39	0,9	0	-	2	1,48	0	-	2,38*	0	2000	[T] _B = 1,48 μM
40	0,35	0	-	2	0,86	0	-	1,21*	0	2000	[T] _B = 0,86 μM
41	0,2	0	-	2	0,47	0	-	0,67*	0	2000	[T] _B = 0,47 μM
42	116	0	0	38	34,01	0	0	150	0	0	[T] _B /[P] = 0,895
43	137,76	-	0	38	12,24	-	0	150	250	0	[T] _B /[P] = 0,322
44	147,6	-	0	38	2,38	-	0	150	2000	0	[T] _B /[P] = 0,0626
45	41,9	0	-	8,3	8,07	0	-	50	0	20	[T] _B /[P] = 0,972
46	48	-	-	8,3	2,00	-	-	50	250	20	[T] _B /[P] = 0,241
47	49,2	-	-	8,3	0,77	-	-	50	1000	20	[T] _B /[P] = 0,0923
48	44,9	0	-	8,3	15,11	0	-	50	0	1000	[T] _B /[P] = 1,82
49	39,2	-	-	8,3	10,79	-	-	50	250	1000	[T] _B /[P] = 1,3
50	43	-	-	8,3	7,00	-	-	50	1000	1000	[T] _B /[P] = 0,843
51	32,6	0	-	8,3	17,43	0	-	50	0	10000	[T] _B /[P] = 2,1
52	35,2	-	-	8,3	14,77	-	-	50	250	10000	[T] _B /[P] = 1,78
53	40	-	-	8,3	9,96	-	-	50	1000	10000	[T] _B /[P] = 1,2
54	0	437,3	0	27,4	0	76,72	0	0	514	0	[D] _B /[P] = 2,8
55	0	434,3	-	27,4	0	79,73	-	0	514	10000	[D] _B /[P] = 2,91
56	-	463,3	0	27,4	-	50,69	0	500	514	0	[D] _B /[P] = 1,85
57	-	514	-	27,4	-	0	-	500	514	10000	[D] _B /[P] = 0
58	0	40,7	0	10	0	15,3	0	0	56	0	[D] _B /[P] = 1,53
59	0	41,3	-	10	0	14,7	-	0	56	1000	[D] _B /[P] = 1,47
60	-	44,5	0	10	-	11,5	0	50	56	0	[D] _B /[P] = 1,15
61	-	53	-	10	-	3,01	-	50	56	1000	[D] _B /[P] = 0,301

FONTE: Adaptado de Jiang e Ninfa (2007).

*Dados obtidos pela soma das concentrações de ligante livre e ligado de dados experimentais de Jiang e Ninfa (2007)

**Aproximação, considerando PII saturada pelo efetor

*** Dados não reportados e não calculáveis a partir dos dados fornecidos

modelos. O conjunto de dados para a segunda validação consistiu nos conjuntos de dados que não continham informação completa com relação à concentração de efetor livre para um ou mais ligantes (não determinados experimentalmente).

5.3 MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO

Para cada um dos quatro modelos, o algoritmo de otimização Enxame de Partículas (*Particle Swarm Optimization* ou PSO) foi utilizado para se encontrar valores para as constantes de dissociação que minimizavam a seguinte função objetivo, usando o conjunto de dados de otimização:

$$SS = \sum_{i=1}^6 ([T]_{BiM} - [T]_{BiE})^2 + \sum_{i=7}^{12} ([D]_{BiM} - [D]_{BiE})^2 + \sum_{i=13}^{19} ([G]_{BiM} - [G]_{BiE})^2 \quad (11)$$

onde SS é a soma dos quadrados, o subscrito i representa a i ésima linha de dados na Tabela 4, o subscrito M denota o valor calculado pelo modelo e o subscrito E denota o valor experimental de Jiang e Ninfa (2007). O PSO foi implementado usando uma sub-rotina em linguagem FORTRAN baseada em van den Bergh e Engelbrecht (2006). Um conjunto de estimativas iniciais para as constantes de dissociação foi obtido usando-se as sub-rotinas geradoras de números randômicos ran1 e ran3 (©Numerical Recipes). O número de interações realizadas foi de 10000 e o critério de parada foi quando SS chegava a um valor menor que 10^{-3} . Como o PSO é um algoritmo estocástico, as estimativas das constantes de dissociação são a média dos valores obtidos após cinco procedimentos de estimação que foram inicializados com cinco diferentes estimativas iniciais randômicas. Os valores de desvio padrão para cada parâmetro em cada modelo estão no Apêndice 4.

5.4 CÁLCULO DO ERRO RELATIVO TOTAL

Para cada modelo, o método de Broyden para resolução de equações não-lineares foi implementado em uma sub-rotina em linguagem FORTRAN (PRESS *et al.*, 1992) e usado para achar os valores de $[T]$, $[D]$ e $[G]$ para cada conjunto de dados na Tabela 4, através da concentração total dos efetores ($[T]_T$, $[D]_T$ e $[G]_T$) usada no experimento (TABELA 4) e dos valores das constantes de dissociação obtidos pelo algoritmo PSO (TABELA 5). Isto foi necessário, pois as equações (7a) a (7c) não são explícitas em $[T]$, $[D]$ e $[G]$ para a maior parte dos dados experimentais.

$[T]_B$, $[D]_B$ e $[G]_B$ foram calculados, levando em conta a concentração total dos efetores (TABELA 4) e os valores de $[T]$, $[D]$ e $[G]$ obtidos através do método de Broyden. O erro relativo total foi calculado usando os valores obtidos e os valores experimentais (TABELA 4) através da Eq. (12):

$$ERT = \sum_{i=1}^{61} \left| \frac{DPM_i - DE_i}{DE_i} \right| \quad (12)$$

onde ERT é o erro relativo total, DPM é o valor predito pelo modelo e DE é o valor experimental.

5.5 EXPLORAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS ESTADOS DE PII

O processo de exploração do efeito das concentrações dos efetores nos estados de PII foi realizado somente para M3. A soma das concentrações de todos os estados de PII é igual à concentração total de proteína PII e a concentração de cada estado tem sua própria equação (TABELA 3). Substituindo os valores dos K_d 's obtidos através do método de otimização e os valores da concentração de efetores livres obtidos através do método de Broyden nas equações da Tabela 3, chega-se em um sistema de equações lineares com 20 equações e 20 incógnitas (que seriam as concentrações de cada estado da Tabela 3). Este sistema foi resolvido usando o

programa TK Solver 4.0™ e valores consistentes para as concentrações dos diversos estados de PII foram obtidos.

Quando a uridililação foi levada em conta, um valor de K_U foi fixado e o mesmo procedimento foi realizado, porém, agora, com o sistema contendo 35 equações e 35 incógnitas.

5.6 CÁLCULO DA RELAÇÃO ENTRE GLUTAMINA E K_U

Para calcular a relação entre a concentração de glutamina e a constante de pseudo-equilíbrio K_U , foram extraídos dados da figura 2B do trabalho de Jiang e Ninfa (2011) que correlaciona a concentração de glutamina em mM na abscissa com o grau de uridililação médio de GlnB na ordenada. Neste experimento, Jiang e Ninfa (2011) mantiveram as concentrações totais de ATP, 2-OG e GlnB fixas em 1000 μ M, 100 μ M e 0,5 μ M, respectivamente. A determinação do valor de K_U foi feita utilizando as equações para uridililação (APÊNDICE 3) com os valores das constantes de dissociação listadas para M3 na Tabela 5. As equações foram codificadas em TK Solver 4.0™. Para um dado valor de K_U , a resolução deste conjunto de equações fornece as concentrações de todos os estados, permitindo o cálculo do grau médio de uridililação que pode ser comparado com o grau médio de uridililação obtido por Jiang e Ninfa (2011) para uma dada concentração de glutamina. O método da bissecção foi usado para cada concentração de glutamina usada por Jiang e Ninfa (2011), para chegar a valores de K_U que dessem um grau médio de uridililação igual aos valores experimentais relatados por Jiang e Ninfa (2011) para determinadas concentrações de glutamina. Este procedimento levou a 12 conjuntos de dados da forma “(gln, K_U)”. Este conjunto de dados foi traçado na Figura 22. Devido ao perfil sigmóide da curva obtida, uma equação com a mesma forma matemática da equação de Hill foi usada para descrever a dependência de K_U em relação à concentração de glutamina:

$$K_U = \frac{b_1 \cdot [\text{gln}]^n}{b_2 + [\text{gln}]^n} \quad (13)$$

onde b_1 e b_2 são parâmetros empíricos, n é o coeficiente de Hill e $[gln]$ é a concentração de glutamina em milimolar. Os valores dos parâmetros b_1 , b_2 e n foram calculados utilizando o aplicativo MARQFIT (para ajuste de curvas de equações lineares) do programa TK Solver 4.0™.

6 RESULTADOS

Os dados experimentais extraídos do trabalho de Jiang e Ninfa (2007) se encontram na Tabela 4. Os símbolos presentes na Tabela 4 são: $[T]$, concentração de ATP; $[D]$, concentração de ADP; $[G]$, concentração de 2-OG; $[P]$, concentração de PII; subscrito f, efetor livre; subscrito b, efetor ligado; subscrito t, total de efetor. Nesta tabela, os valores representados em negrito mostram a origem dos dados que foram usados tanto para o procedimento de otimização dos parâmetros quanto para o cálculo do erro relativo dos modelos. Alguns destes valores correspondem diretamente à concentração de efetor ligado (linhas 1 a 41 da Tabela 4) e outros correspondem à razão entre a concentração de efetor ligado e a concentração de proteína usada no experimento (linhas 42 a 61 da Tabela 4). Já os dados que não puderam ser extraídos diretamente ou indiretamente (ou seja, por cálculos) do trabalho de Jiang e Ninfa (2007) estão representados por um traço (Tabela 4). Nos casos das linhas 13 a 19 da Tabela 4, foi considerado que a proteína PII estava saturada por ATP, tornando possível o uso destes dados para a etapa de otimização.

6.1 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS E SELEÇÃO DO MODELO

Na Tabela 5 são mostrados os valores das constantes de dissociação obtidas através dos ajustes dos quatro modelos ao conjunto de dados de otimização e também a soma dos módulos dos erros relativos no ajuste aos três conjuntos de dados (otimização, primeira validação e segunda validação) extraídos de Jiang e Ninfa (2007). O somatório do erro relativo obtido no conjunto da segunda validação foi usado como critério principal para comparação entre os modelos já que é o único conjunto de dados que contém, primeiramente, experimentos em que ocorre competição entre ATP e ADP e, em segundo lugar, experimentos nos quais os três efetores estão presentes simultaneamente. Usando este critério, os modelos M3 e M4 tinham ajustes significativamente melhores do que modelos M1 e M2.

TABELA 5 - VALORES DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO AJUSTADAS E ERRO RELATIVO DOS MODELOS

	Valores das constantes de dissociação* (μM)			
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
K_{T1}	46	43	46	51
K_{T2}	159	291	234	121
K_{T3}	699	-.**	-	621
K_{D1}	30	17	16	18
K_{D2}	-	63	77	42
K_{D3}	-	-	-	215
K_{G1}	10	11	11	11
K_{G2}	142	145	144	143
K_{G3}	5079	5622	6845	5823
	Σ Erro Relativo			
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
Otimização	0,927	0,680	0,817	0,713
1ª Validação	0,390	0,379	0,456	0,378
2ª Validação	7,747	9,736	6,367	6,199
Total	9,05	10,77	7,66	7,38

FONTE: O autor (2013)

*Os valores reportados para as constantes de dissociação representam a média de cinco resultados obtidos com a execução do algoritmo PSO, usando diferentes estimativas iniciais geradas aleatoriamente.

** O traço indica que a constante não existe no modelo.

O principal problema de M1, no qual se assume que existe apenas uma constante de dissociação para ADP, é que este modelo superestima os valores de ADP ligado quando ATP está presente (TABELA 6, linhas 56, 57, 60 e 61). Isto sugere que a ligação de ATP à PII pode fazer com que haja uma diminuição na afinidade de GlnB para ligar ADP.

M2, no qual se assume que ATP e ADP não podem se ligar ao mesmo trímero, não ajustou bem aos experimentos nos quais ocorre competição entre ATP e ADP (TABELA 6). Este resultado sugere que GlnB pode apresentar ATP e ADP ligados em um mesmo trímero.

M3 e M4 se ajustaram bem à maioria dos dados experimentais. O ajuste levemente melhor que foi obtido com M4 (TABELA 5), no qual se assume três classes de sítios para cada ligante, se deve ao fato de que este modelo contém dois parâmetros a mais do que M3, no qual se assume que as ligações da segunda e terceira moléculas de um mesmo nucleotídeo têm a mesma K_d . A literatura não fornece dados suficientes para se diferenciar entre M3 e M4, já que nenhuma evidência estrutural com relação à ligação subsequente de moléculas de ATP à GlnB de *E. coli* está disponível. Vale salientar que Jiang e Ninfa (2007) obtiveram um

ajuste bom para a ligação de ATP considerando tanto duas (assim como no caso de M3) quando três (assim como no caso de M4) classes de sítios de ligação.

M1 e M3 foram escolhidos para uma comparação dos erros de ajuste (FIGURA 10 e FIGURA 11). M1 foi escolhido por ser consistente com o ajuste realizado por Jiang e Ninfa (2007), que sugeriram três classes de sítios para ATP e uma classe para ADP. M2 não foi levado em conta para a comparação, pois apresentou o pior ajuste de todos os modelos. Através do método utilizado onde se verificou a soma do erro relativo total, não é possível diferenciar estatisticamente entre M3 e M4. Além disso, estes dois modelos apresentam erros relativos similares para cada conjunto de dados individual (TABELA 6). M3 foi escolhido em detrimento de M4, pois apresenta um número menor de parâmetros e resultou em um ajuste quase tão bom quanto M4.

Apesar de tanto M1 quanto M3 terem apresentado bons ajustes para os dados experimentais de Jiang e Ninfa (2007), M3 apresentou um erro relativo total menor que M1, principalmente devido a sua melhor capacidade em descrever o segundo conjunto de dados de validação (TABELA 5). Em especial, M3 foi capaz de prever a quantidade de ADP ligado melhor que M1, apesar de M1 ser levemente melhor em prever ATP ligado. Os maiores erros relativos de M3 foram obtidos para as previsões das concentrações de ATP ou ADP ligado nos experimentos com as menores concentrações destes ligantes (TABELA 6, linhas 54-61, FIGURA 11). Para ambos modelos, o maior erro relativo ocorreu para predição de ADP ligado no experimento onde a concentração de 2-OG era cerca de 20 vezes maior que as concentrações de ATP e ADP (TABELA 6, linha 61), em ambos os casos houve uma superestimação da quantidade de ADP ligado. Isto pode ter acontecido pela própria sensibilidade do método de medição de efetor ligado realizado por Jiang e Ninfa (2007) que poderia apresentar maior erro durante a medição de valores mais baixos de efetor ligado. Por outro lado, tanto M1 quanto M3 foram capazes de prever bem a quantidade de ATP ligado, mesmo quando a concentração de 2-OG era alta (TABELA 6, linhas 48-53).

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS ERROS RELATIVOS PARA OS QUATRO MODELOS

#	Dados experimentais	Modelo 1 (M1)	Erro Relativo de M1	Modelo 2 (M2)	Erro Relativo de M2	Modelo 3 (M3)	Erro Relativo de M3	Modelo 4 (M4)	Erro Relativo de M4
CONJUNTO DE DADOS DE OTIMIZAÇÃO									
1	$[T]_B = 68 \mu\text{M}$	66,91 μM	-0,02	71,67 μM	0,05	73,78 μM	0,09	68,52 μM	0,00
2	$[T]_B = 61 \mu\text{M}$	62,55 μM	0,03	67,01 μM	0,10	69,86 μM	0,15	64,56 μM	0,06
3	$[T]_B = 39 \mu\text{M}$	40,18 μM	0,03	38,99 μM	-0,00	42,05 μM	0,08	42,58 μM	0,09
4	$[T]_B = 27 \mu\text{M}$	25,99 μM	-0,04	24,28 μM	-0,10	25,40 μM	-0,06	27,14 μM	0,01
5	$[T]_B = 8 \mu\text{M}$	8,22 μM	0,03	8,13 μM	0,02	7,99 μM	0,00	8,05 μM	0,01
6	$[T]_B = 4 \mu\text{M}$	3,95 μM	-0,01	4,01 μM	0,00	3,89 μM	-0,03	3,78 μM	-0,06
7	$[D]_B = 78 \mu\text{M}$	80,33 μM	0,03	78,12 μM	0,00	76,85 μM	-0,01	72,23 μM	-0,07
8	$[D]_B = 74 \mu\text{M}$	79,12 μM	0,07	75,52 μM	0,02	73,51 μM	-0,01	68,19 μM	-0,08
9	$[D]_B = 42 \mu\text{M}$	52,58 μM	0,25	44,60 μM	0,06	41,45 μM	-0,01	41,77 μM	-0,06
10	$[D]_B = 31 \mu\text{M}$	32,66 μM	0,05	29,24 μM	-0,06	27,72 μM	-0,11	28,88 μM	-0,07
11	$[D]_B = 9 \mu\text{M}$	7,43 μM	-0,17	8,21 μM	-0,09	8,23 μM	-0,09	8,23 μM	-0,09
12	$[D]_B = 5 \mu\text{M}$	4,63 μM	-0,07	5,37 μM	0,07	5,43 μM	0,09	5,35 μM	0,07
13	$[G]_B = 57 \mu\text{M}$	56,25 μM	-0,01	56,11 μM	-0,02	55,77 μM	-0,02	55,95 μM	-0,02
14	$[G]_B = 53 \mu\text{M}$	53,35 μM	0,01	53,18 μM	0,00	52,96 μM	0,00	53,10 μM	0,00
15	$[G]_B = 44 \mu\text{M}$	44,41 μM	0,01	44,12 μM	0,00	44,10 μM	0,00	44,18 μM	0,00
16	$[G]_B = 41 \mu\text{M}$	39,71 μM	-0,03	39,35 μM	-0,04	39,37 μM	-0,04	39,43 μM	-0,04
17	$[G]_B = 25 \mu\text{M}$	25,52 μM	0,02	25,02 μM	0,00	25,04 μM	0,00	25,06 μM	0,00
18	$[G]_B = 17 \mu\text{M}$	17,70 μM	0,04	17,27 μM	0,02	17,27 μM	0,02	17,28 μM	0,02
19	$[G]_B = 9 \mu\text{M}$	8,99 μM	0,00	8,76 μM	-0,03	8,76 μM	-0,03	8,76 μM	-0,03
CONJUNTO DE DADOS DA 1ª VALIDAÇÃO									
20	$[T]_B = 48 \mu\text{M}$	52,76 μM	0,10	54,75 μM	0,14	58,60 μM	0,22	55,31 μM	0,15
21	$[T]_B = 16 \mu\text{M}$	15,90 μM	-0,01	15,14 μM	-0,05	15,29 μM	-0,04	16,10 μM	0,01
22	$[D]_B = 62 \mu\text{M}$	72,67 μM	0,17	64,37 μM	0,04	60,57 μM	-0,02	56,88 μM	-0,08
23	$[D]_B = 20 \mu\text{M}$	18,81 μM	-0,06	18,29 μM	-0,09	17,80 μM	-0,11	18,44 μM	-0,08
24	$[G]_B = 48 \mu\text{M}$	49,18 μM	0,02	48,96 μM	0,02	48,86 μM	0,02	48,96 μM	0,02
25	$[G]_B = 35 \mu\text{M}$	34,01 μM	-0,03	33,58 μM	-0,04	33,61 μM	-0,04	33,65 μM	-0,04
CONJUNTO DE DADOS DA 2ª VALIDAÇÃO									
26	$[T]_B = 21 \mu\text{M}$	19,70 μM	-0,06	20,60 μM	-0,02	21,90 μM	0,04	20,51 μM	-0,02
27	$[T]_B = 19,5 \mu\text{M}$	16,78 μM	-0,14	16,61 μM	-0,15	17,89 μM	-0,08	17,65 μM	-0,10
28	$[T]_B = 17,5 \mu\text{M}$	13,49 μM	-0,23	12,63 μM	-0,28	13,43 μM	-0,23	14,17 μM	-0,19
29	$[T]_B = 14 \mu\text{M}$	10,52 μM	-0,25	10,52 μM	-0,25	10,07 μM	-0,28	10,82 μM	-0,23
30	$[T]_B = 10 \mu\text{M}$	7,68 μM	-0,23	7,28 μM	-0,27	7,30 μM	-0,27	7,59 μM	-0,24

continua

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS ERROS RELATIVOS PARA OS QUATRO MODELOS

#	Dados experimentais	continuação e conclusão							
		Modelo 1 (M1)	Erro Relativo de M1	Modelo 2 (M2)	Erro Relativo de M2	Modelo 3 (M3)	Erro Relativo de M3	Modelo 4 (M4)	Erro Relativo de M4
31	$[T]_B = 6 \mu\text{M}$	5,05 μM	-0,16	4,90 μM	-0,18	4,83 μM	-0,20	4,82 μM	-0,20
32	$[T]_B = 3,5 \mu\text{M}$	2,66 μM	-0,24	2,63 μM	-0,25	2,56 μM	-0,27	2,48 μM	-0,29
33	$[T]_B = 2 \mu\text{M}$	1,55 μM	-0,22	1,54 μM	-0,23	1,49 μM	-0,25	1,44 μM	-0,28
34	$[T]_B = 3,35 \mu\text{M}$	3,72 μM	0,11	3,64 μM	0,09	3,78 μM	0,13	3,82 μM	0,14
35	$[T]_B = 2,97 \mu\text{M}$	3,53 μM	0,19	3,35 μM	0,13	3,49 μM	0,18	3,64 μM	0,23
36	$[T]_B = 2,75 \mu\text{M}$	3,24 μM	0,18	2,99 μM	0,09	3,12 μM	0,14	3,37 μM	0,23
37	$[T]_B = 2,3 \mu\text{M}$	2,76 μM	0,20	2,51 μM	0,09	2,60 μM	0,13	2,88 μM	0,25
38	$[T]_B = 1,95 \mu\text{M}$	2,23 μM	0,14	2,08 μM	0,07	2,12 μM	0,09	2,27 μM	0,17
39	$[T]_B = 1,48 \mu\text{M}$	1,65 μM	0,11	1,61 μM	0,09	1,60 μM	0,08	1,62 μM	0,10
40	$[T]_B = 0,86 \mu\text{M}$	1,00 μM	0,16	0,99 μM	0,15	0,98 μM	0,14	0,97 μM	0,13
41	$[T]_B = 0,47 \mu\text{M}$	0,58 μM	0,23	0,58 μM	0,23	0,57 μM	0,21	0,56 μM	0,20
42	$[T]_B/[P] = 0,895$	1,190	0,330	1,125	0,258	1,195	0,335	1,253	0,400
43	$[T]_B/[P] = 0,322$	0,437	0,357	0,093	-0,710	0,333	0,033	0,320	-0,007
44	$[T]_B/[P] = 0,0626$	0,0500	-0,2002	0,000	-0,998	0,0282	-0,5497	0,029	-0,544
45	$[T]_B/[P] = 0,972$	0,941	-0,032	0,872	-0,103	0,897	-0,077	0,963	-0,010
46	$[T]_B/[P] = 0,241$	0,298	0,236	0,020	-0,918	0,190	-0,214	0,190	-0,211
47	$[T]_B/[P] = 0,0923$	0,090	-0,022	0,000	-0,996	0,049	-0,471	0,050	-0,464
48	$[T]_B/[P] = 1,82$	1,684	-0,075	1,587	-0,128	1,663	-0,086	1,746	-0,041
49	$[T]_B/[P] = 1,3$	1,126	-0,134	0,753	-0,421	1,170	-0,100	1,168	-0,101
50	$[T]_B/[P] = 0,843$	0,802	-0,049	0,032	-0,962	0,687	-0,186	0,691	-0,180
51	$[T]_B/[P] = 2,1$	2,058	-0,020	2,123	0,011	2,160	0,029	2,075	-0,012
52	$[T]_B/[P] = 1,78$	1,675	-0,059	2,050	0,152	1,835	0,031	1,822	0,024
53	$[T]_B/[P] = 1,2$	1,317	0,097	1,016	-0,153	1,444	0,204	1,450	0,208
54	$[D]_B/[P] = 2,8$	2,926	0,045	2,838	0,014	2,788	-0,004	2,614	-0,067
55	$[D]_B/[P] = 2,91$	2,926	0,005	2,838	-0,025	2,788	-0,042	2,614	-0,102
56	$[D]_B/[P] = 1,85$	2,385	0,289	2,719	0,470	2,305	0,246	2,147	0,161
57	$[D]_B/[P] = 0$	0,877	-*	0,001	-	0,579	-	0,489	-
58	$[D]_B/[P] = 1,53$	1,793	0,172	1,447	-0,054	1,323	-0,135	1,364	-0,108
59	$[D]_B/[P] = 1,47$	1,793	0,220	1,447	-0,016	1,323	-0,100	1,364	-0,072
60	$[D]_B/[P] = 1,15$	1,549	0,347	1,241	0,079	1,147	-0,003	1,165	0,013
61	$[D]_B/[P] = 0,301$	0,964	2,202	0,100	-0,667	0,542	0,802	0,451	0,499
			$\Sigma =9,05$		$\Sigma =10,77$		$\Sigma =7,66$		$\Sigma =7,38$

FONTE: O autor (2013). Os números dos dados experimentais da Tabela 6 correspondem aos mesmos números dos dados da Tabela 4.

*Traço representa dado indisponível.

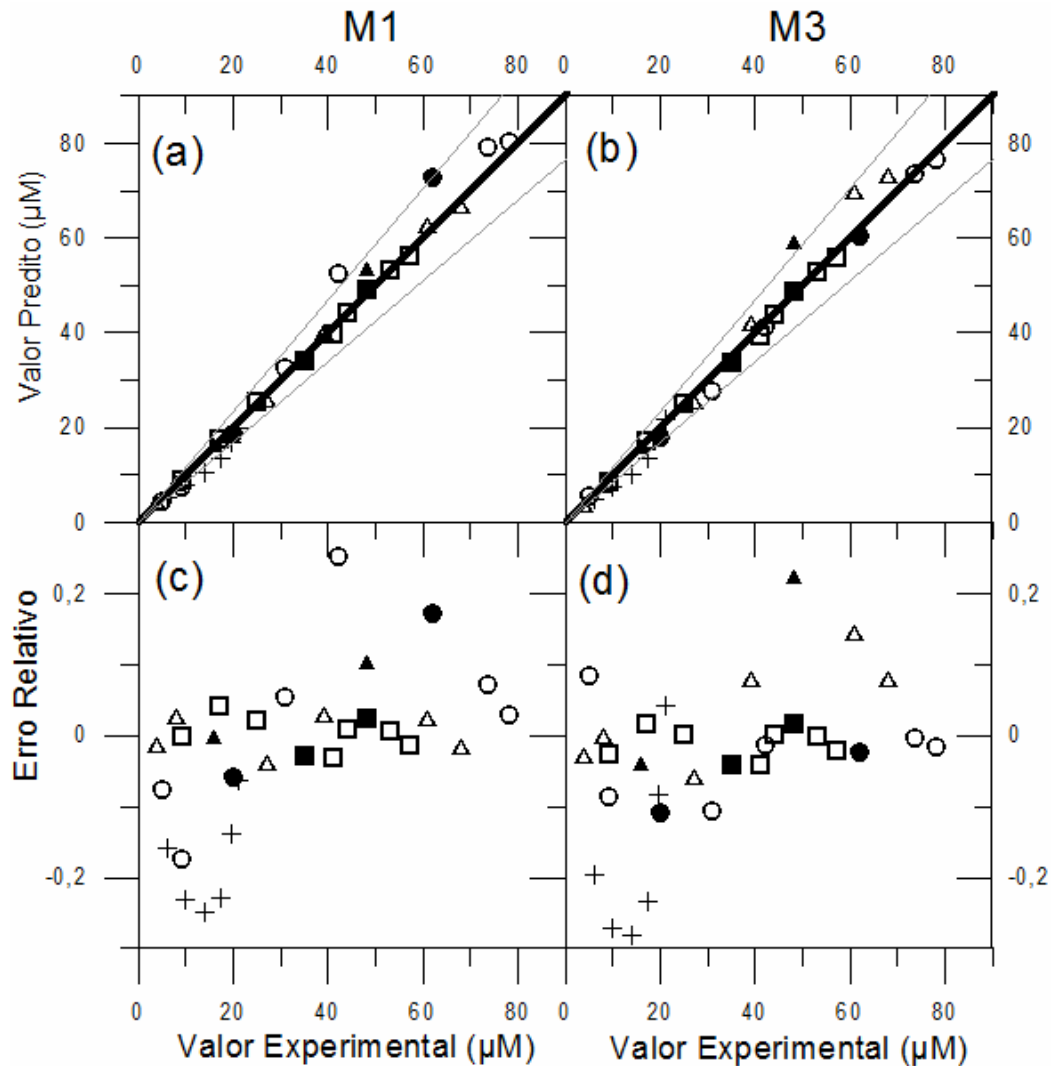


FIGURA 10 - ANÁLISE DE ERRO DE M1 E M3 PARA VALORES EXPERIMENTAIS ACIMA DE 4 μM . Os gráficos de M1 estão no lado esquerdo e de M3 no lado direito. O valor experimental e o valor predito representam concentração absoluta de efetor. Nos gráficos (a) e (b) a linha escura representa erro zero enquanto as linhas cinza correspondem a um erro de 15% para mais ou para menos. Gráficos (c) e (d) representam o erro relativo dos gráficos (a) e (b), respectivamente. Símbolos: (Δ) dados de otimização para ATP; (\circ) dados de otimização para ADP; (\square) Dados de otimização para 2-OG, (\blacktriangle) dados de 1ª validação para ATP; (\bullet) dados de 1ª validação para ADP; (\blacksquare) dados de 1ª validação para 2-OG; (+) dados de 2ª validação para ATP. FONTE: O autor (2013)

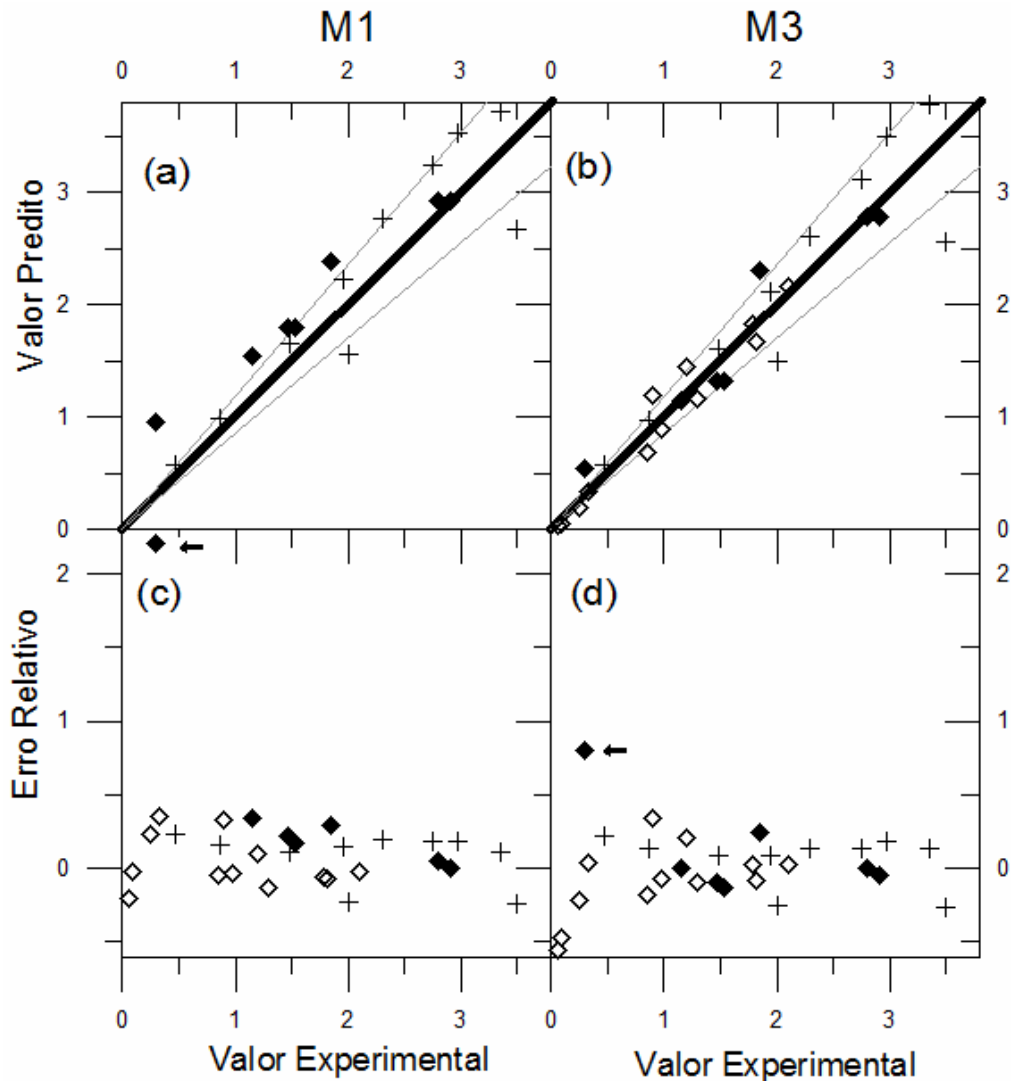


FIGURA 11 - ANÁLISE DE ERRO DE M1 E M3 PARA VALORES EXPERIMENTAIS ABAIXO DE 4 μM . Os gráficos de M1 estão no lado esquerdo e de M3 no lado direito. O valor experimental e o valor predito representam concentração absoluta de efetor (μM) ou a razão entre concentração de efetor e concentração de proteína ($\mu\text{M}/\mu\text{M}$). Nos gráficos (a) e (b) a linha escura representa erro zero enquanto as linhas cinza correspondem a um erro de 15% para mais ou para menos. Gráficos (c) e (d) representam o erro relativo dos gráficos (a) e (b), respectivamente. Símbolos: (+) dados de 2ª validação para ATP; (\diamond) dados de 2ª validação para a razão ATP/PII; (\blacklozenge) dados de 2ª validação para a razão ADP/PII. As setas nos gráficos (c) e (d) representam o valor que resultou no maior erro relativo dos modelos. FONTE: O autor (2013)

Também foram traçados gráficos para comparação entre os resultados obtidos com M3 e os dados de Jiang e Ninfa (2007) (FIGURA 12 e FIGURA 13). M3 se ajustou bem à maioria dos dados. Com exceção da curva de ligação de ATP à GlnB em concentrações baixas de 2-OG (FIGURA 12B), as demais curvas preditas pelo modelo se ajustaram bem aos dados experimentais (FIGURA 12). Já para a medição do número médio de moléculas ligadas ao trímero (FIGURA 13), a maioria dos valores preditos por M3 ficou bem próximo aos valores experimentais de Jiang e Ninfa (2007). Vale ressaltar que Jiang e Ninfa (2007) relataram a possibilidade de erro de até 15% para seus dados experimentais. Os maiores erros relativos de M3 ocorreram para os menores valores experimentais de ATP e ADP ligados, como já mencionado anteriormente.

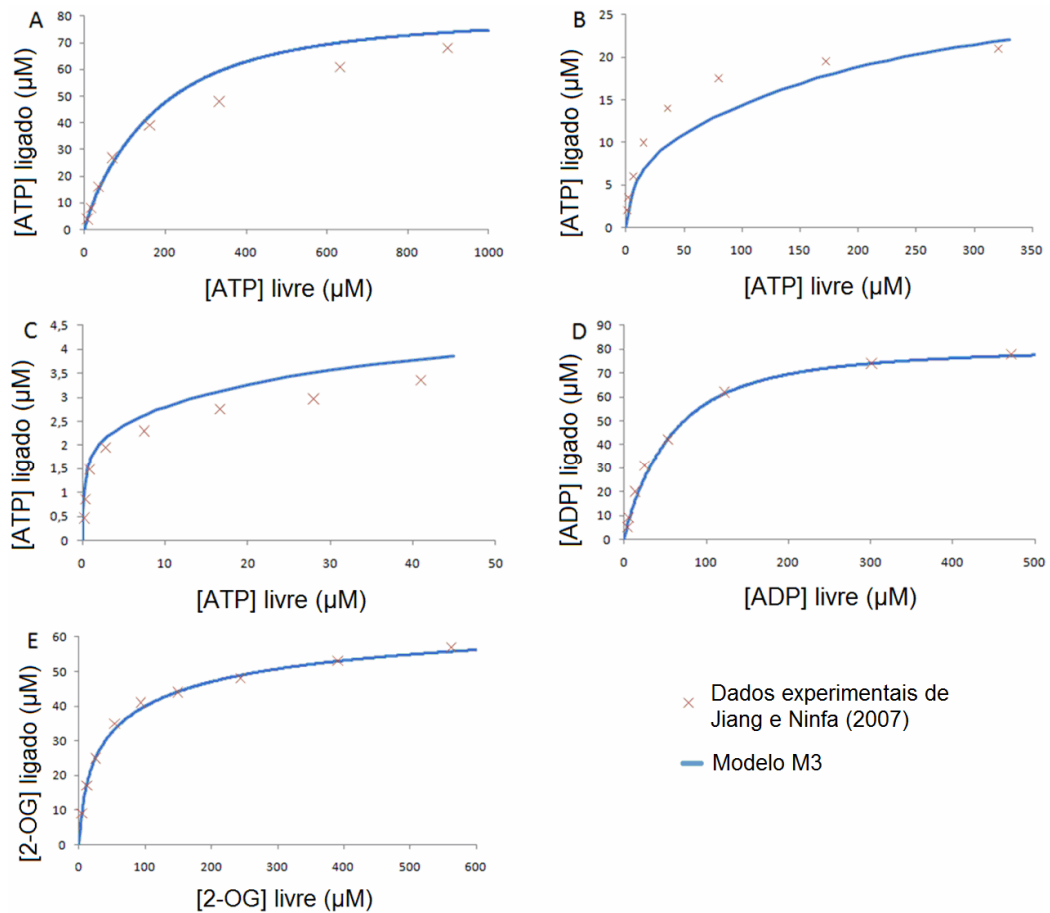


FIGURA 12 - COMPARAÇÃO ENTRE M3 E DADOS EXPERIMENTAIS DE JIANG E NINFA (2007) PARTE 1. A) Ligação de ATP a 27,4 μM de GlnB em ausência de ADP e 2-OG. B) Ligação de ATP em presença de 0,05 mM de 2-OG e 9,75 μM de GlnB. C) Ligação de ATP em presença de 2 mM de 2-OG e 2 μM de GlnB. D) Ligação de ADP a 27,4 μM de GlnB em ausência de ATP e 2-OG. E) Ligação de 2-OG em presença de 4 mM de ATP e 30 μM de GlnB. As cruces vermelhas representam os dados experimentais de Jiang e Ninfa (2007) e as curvas azuis representam as previsões de M3. FONTE: O autor (2013) usando dados experimentais de Jiang e Ninfa (2007)

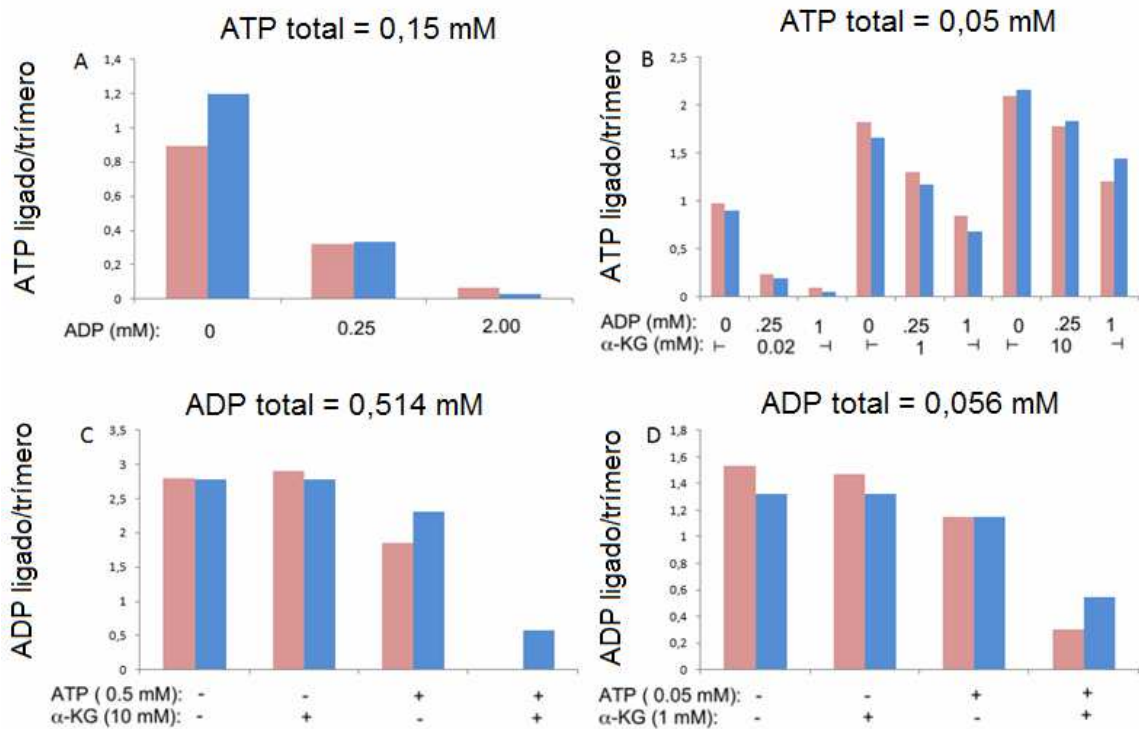


FIGURA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE AS PREVISÕES DE M3 E DADOS EXPERIMENTAIS DE JIANG E NINFA (2007) PARTE 2. Em rosa estão representados os valores experimentais obtidos por Jiang e Ninfa (2007) e em azul estão representadas as previsões do modelo 3. A) Número médio de moléculas de ATP ligadas por trímero de GlnB em diferentes concentrações de ATP. GlnB em concentração de 38 μ M e ATP em concentração de 150 μ M. B) Número médio de moléculas de ATP ligadas por trímero de GlnB em diferentes concentrações de ADP e 2-OG. GlnB em concentração de 8,3 μ M e ATP em concentração de 50 μ M. C) Número médio de moléculas de ADP ligadas por trímero de GlnB em diferentes concentrações de ATP e 2-OG. GlnB em concentração de 27,4 μ M e ADP em concentração de 514 μ M. D) Número médio de moléculas de ADP ligadas por trímero de GlnB em diferentes concentrações de ATP e 2-OG. GlnB em concentração de 10 μ M e ADP em concentração de 56 μ M. FONTE: O autor (2013) usando dados experimentais de Jiang e Ninfa (2007)

6.2 PREDIÇÃO DE EFETORES LIGADOS À GlnB

Devido ao seu bom desempenho na análise anterior, o modelo M3 foi utilizado para prever a ligação de ATP, ADP e 2-OG à GlnB, em faixas de concentrações esperadas para diferentes situações fisiológicas em *E. coli*.

Quando *E. coli* se encontra em um meio que apresenta concentrações de fontes de carbono suficientes para garantir o crescimento do microrganismo, a concentração de ATP intracelular permanece em torno de 3 mM, mesmo em diferentes velocidades de crescimento (SCHNEIDER; GOURSE, 2004; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). Quando *E. coli* é transferida para um

meio pobre em fontes de carbono, a concentração de ATP intracelular decresce rapidamente no início, mas chega um momento em que o decréscimo é atenuado e, mesmo após várias horas, a concentração de ATP se mantém superior a 0,3 mM (GIGLIOBIANCO *et al.*, 2010). A concentração de ADP varia de 0,3 mM, em condições de excesso de fontes de carbono (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010), a 1,1 mM, em condições limitantes de carbono (ROZKOV; ENFORS, 1999). A concentração de 2-OG geralmente varia entre 0,1 e 1,4 mM (SENIOR, 1975; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010), mas pode aumentar para concentrações superiores a 10 mM em períodos com limitação severa de nitrogênio (YUAN *et al.*, 2009). Simulações foram realizadas usando estes intervalos de concentrações de ATP, ADP e 2-OG e considerando a concentração intracelular de GlnB em nível micromolar (MA; BOOGERD; GORYANIN, 2009).

Na ausência de ADP, 2 mM de ATP são suficientes para ocupar 95% dos sítios de ligação de nucleotídeo da GlnB (FIGURA 14a). Com adição de concentrações baixas de ADP (0,3 mM), uma redução significativa na quantidade de ATP ligado à GlnB é observada: de 95% de saturação para 75% de saturação em uma mesma concentração de ATP de 2 mM (FIGURA 14a). Quando ATP está ausente, 0,3 mM de ADP gera uma ocupação de 90% dos sítios de ligação de nucleotídeo da GlnB por ADP (FIGURA 14b). Esta análise sugere indiretamente que, *in vivo*, a maior parte das proteínas GlnB vai estar com todos os três sítios de ligação de ATP/ADP ocupados.

A presença de 2-OG aumenta a quantidade de ATP ligado. É importante ressaltar que, de acordo com M3, isto não é um efeito devido ao 2-OG ser capaz de alterar os valores das constantes de dissociação para ligação de ATP à GlnB (ou seja, os valores das constantes de dissociação permanecem inalterados pela presença de 2-OG). Na realidade, isto acontece porque a presença de 2-OG aumenta o número de estados de GlnB nos quais ATP está ligado: existe um total de 6 estados de GlnB com ATP ligado em ausência de 2-OG e dezesseis estados com ATP ligado em presença de 2-OG (FIGURA 6). Quando ADP não está presente, o aumento da quantidade de ATP ligado na presença de 2-OG é baixo em altas concentrações de ATP, mas mais significativo em baixas concentrações de ATP (FIGURA 14c). Quando ADP está presente, o aumento na quantidade de ATP ligado

na presença de 2-OG é muito maior, especialmente em concentrações baixas de ATP (FIGURA 14d), o que está de acordo com o estudo de Jiang e Ninfa (2007).

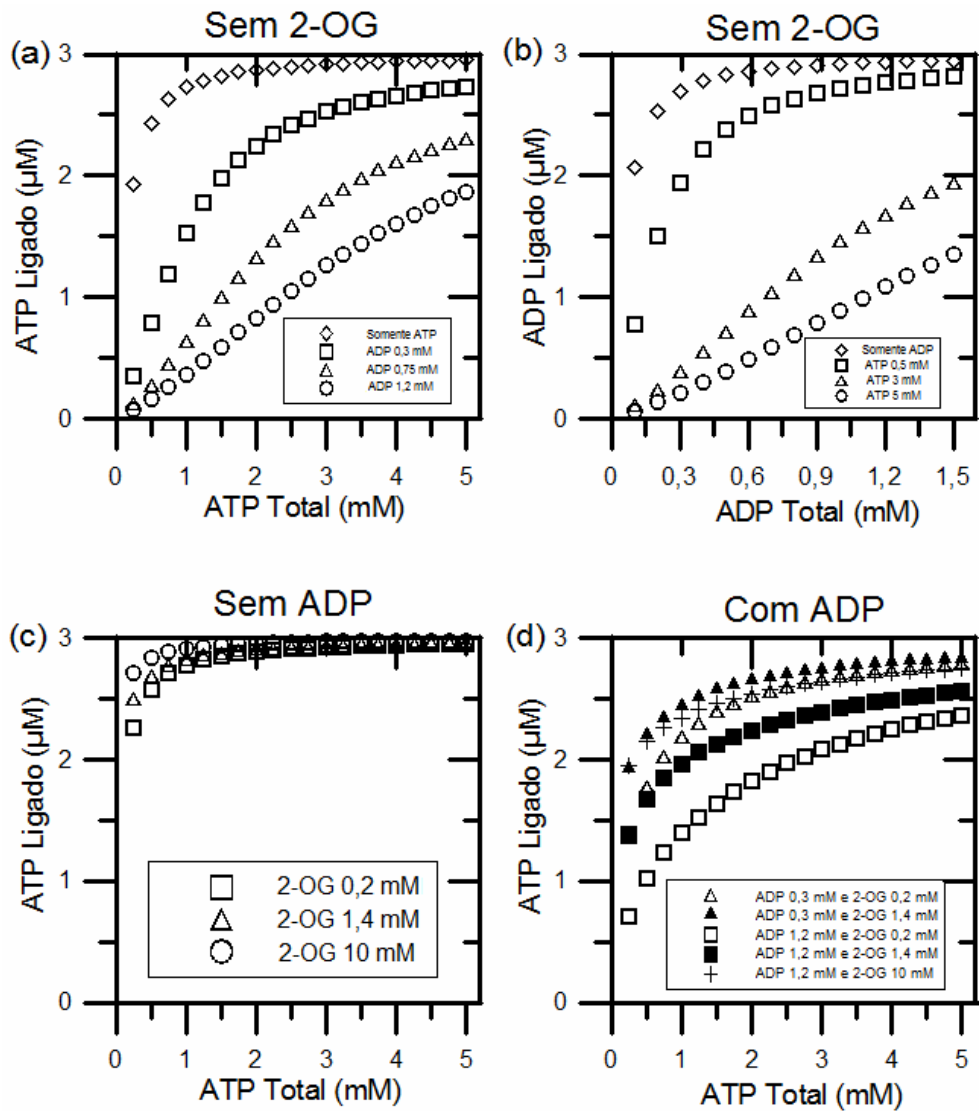


FIGURA 14 – SIMULAÇÃO DE ATP OU ADP LIGADO EM FUNÇÃO DO TOTAL DE ATP OU ADP EM DIFERENTES CONDIÇÕES USANDO M3. GlnB em 1 μM, ou seja, a concentração total de sítios de ligação para ATP/ADP é de 3 μM. FONTE: O autor (2013)

6.3 PREDIÇÕES DOS ESTADOS CONFORMACIONAIS DE GlnB E REGULAÇÃO DA ATASE

Além de ser regulada pelos efetores ATP, ADP e 2-OG, a GlnB de *E. coli* também pode sofrer modificação covalente através de uridililação das subunidades do trîmero.

Esta primeira parte da predição de estados não leva em conta a uridililação, investiga como flutuações nas concentrações de ATP, ADP e 2-OG afetam os estados de GlnB desuridililada. Por exemplo, quando a concentração de nitrogênio celular é alta, a GlnB estará na forma desuridililada. GlnB desuridililada estimula atividade AT quando ela apresenta uma única molécula de 2-OG ligada ao trímero ou quando ela apresenta pelo menos uma molécula de ADP ligada ao trímero (JIANG; NINFA, 2009). Quando GlnB promove a atividade AT da ATase ocorre inativação da GS através de adenililação. M3 foi usado para investigar as proporções destas duas frações de GlnB em função das concentrações de ATP, ADP e 2-OG.

6.3.1 Fração de GlnB com uma única molécula de 2-OG ligada

A fração de GlnB com uma única molécula de 2-OG ligada é dada pela soma dos estados PTG, PT₂G, PT₃G, PTGD, PTGD₂ e PT₂GD (FIGURA 6), doravante estes estados serão chamados de “estados GlnB-G”. Em presença de baixas concentrações de ADP (0,3 mM) e 2-OG (0,1 mM), a maior parte da GlnB estará na forma dos estados GlnB-G para uma grande faixa de concentrações de ATP (FIGURA 15a). Com os aumentos da concentração de 2-OG para 1,4 mM e 10 mM (FIGURAS 15c e 15e, respectivamente), a fração dos estados GlnB-G decai grandemente e os estados de GlnB com duas ou três moléculas de 2-OG ligadas prevalecem. Quando estas simulações são repetidas para uma concentração alta de ADP de 1,2 mM, o comportamento é similar, no sentido de que as curvas nas Figuras 15b, 15d e 15f para os estados com diferentes números de 2-OG ligado são similares aos das Figuras 15a, 15c e 15e, especialmente em concentrações maiores de ATP.

Também foi investigada a dependência da proporção dos estados GlnB-G na concentrações total de nucleotídeos e na razão ATP/ADP. A concentração total de nucleotídeos (ou seja, “ATP+ADP”) não apresentou um efeito significativo na proporção dos estados GlnB-G, isto sendo verdadeiro tanto para uma concentração de 2-OG de 0,1 mM quanto para uma concentração de 1,4 mM (FIGURA 16). Já a

razão ATP/ADP teve um efeito significativo na proporção dos estados GlnB-G, especialmente em concentrações de 2-OG entre 0,3 e 5 mM: quanto menor a razão ATP/ADP, maior a proporção de estados GlnB-G (FIGURA 17). Entretanto, nos extremos das concentrações fisiológicas de 2-OG, 0,1 e 10 mM, a proporção absoluta de estados GlnB-G foi afetada brandamente pela razão ATP/ADP (FIGURA 17). Estes resultados indicam que a fração de estados GlnB-G é afetada tanto pela concentração de 2-OG quanto pela razão ATP/ADP, porém, a resposta à razão ATP/ADP é fraca nos extremos das concentrações fisiológicas reportadas para 2-OG (FIGURA 17).

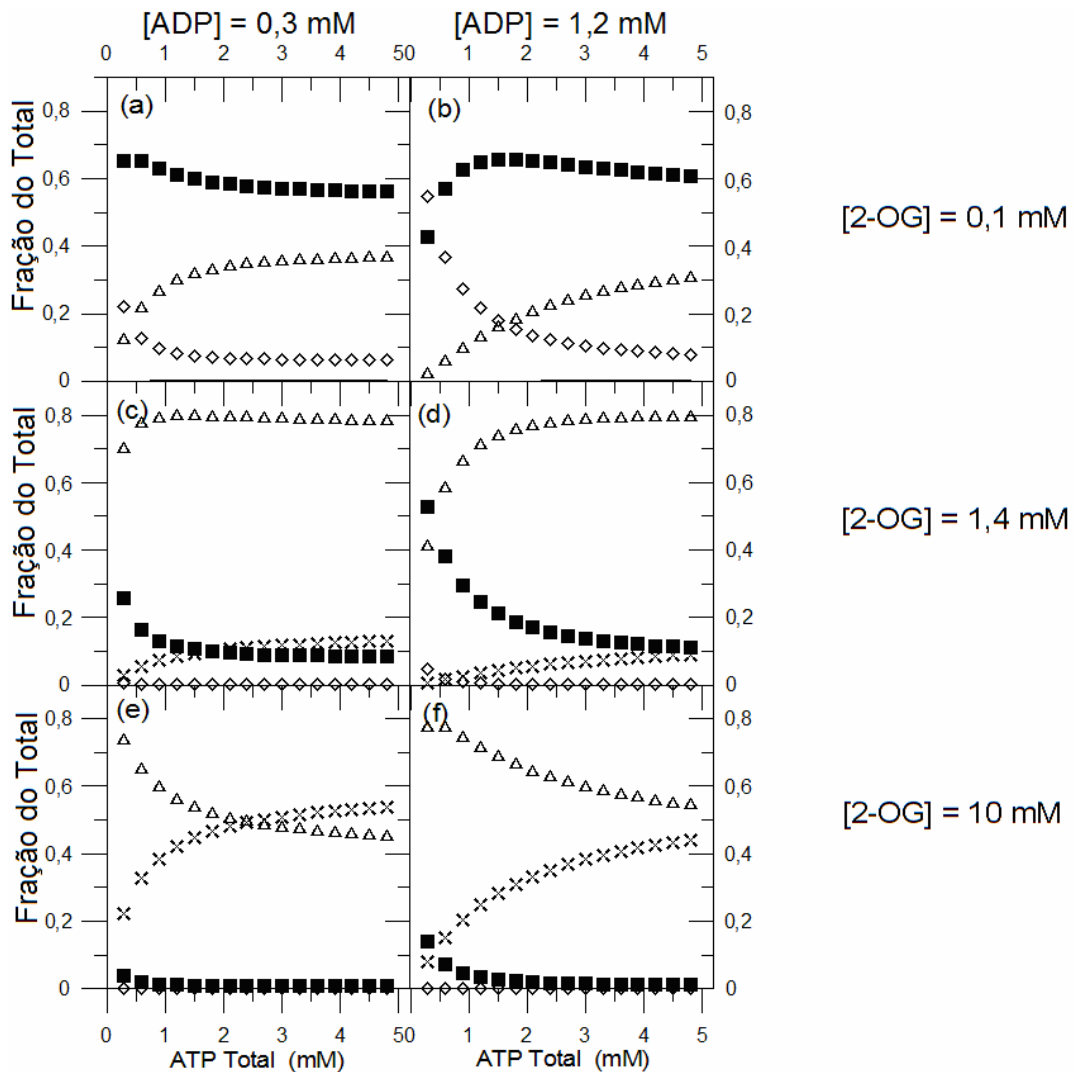


FIGURA 15 - FRAÇÕES DAS POPULAÇÕES DE GlnB COM QUANTIAS DIFERENTES DE 2-OG LIGADO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ATP. Os gráficos foram traçados com as diferentes concentrações de ADP e 2-OG indicadas. Símbolos: (◆) soma dos estados sem 2-OG ligado; (■) soma dos estados com uma única molécula de 2-OG ligada (ou seja, “estados GlnB-G”); (△) soma dos estados com duas moléculas de 2-OG ligadas; (×) soma dos estados com três moléculas de 2-OG ligadas. GlnB em 1 μ M. FONTE: O autor (2013)

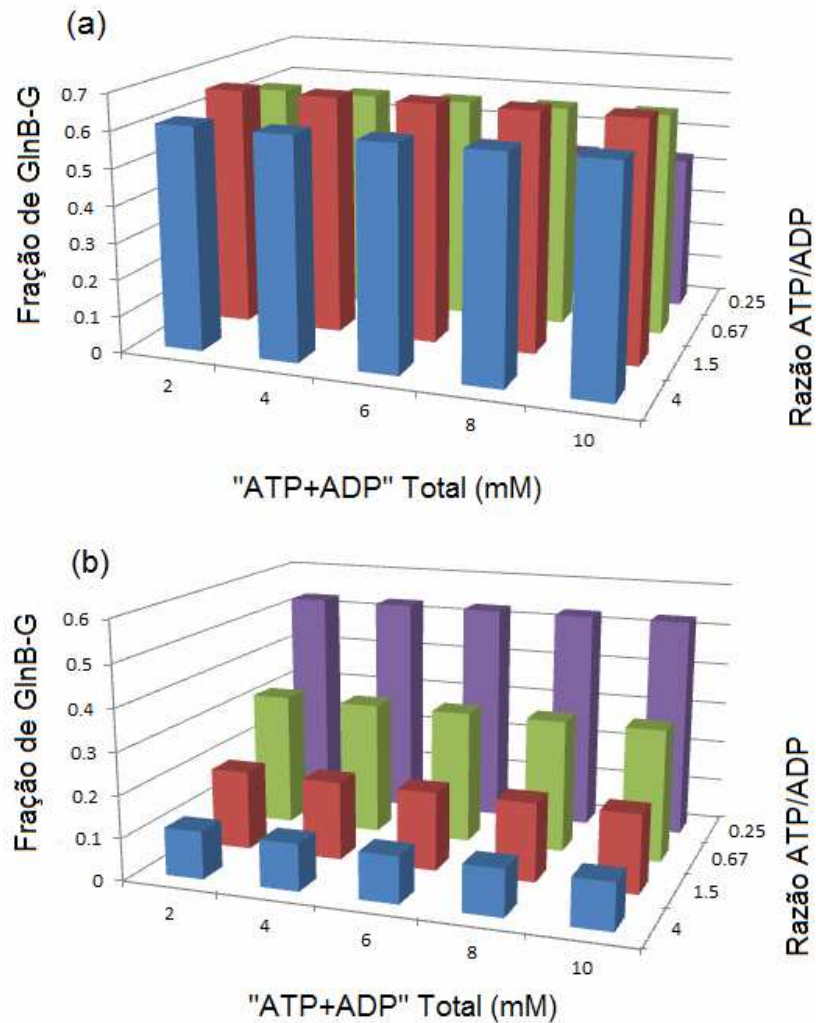


FIGURA 16 - ESTADOS GlnB-G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE "ATP+ADP" E DA RAZÃO ATP/ADP. Os estados GlnB-G são os estados em que as moléculas de GlnB apresentam uma única molécula de 2-OG ligada. (a) 2-OG em 0,1 mM. (b) 2-OG em 1,4 mM. Em ambos gráficos GlnB em concentração de 1 μ M. FONTE: O autor (2013)

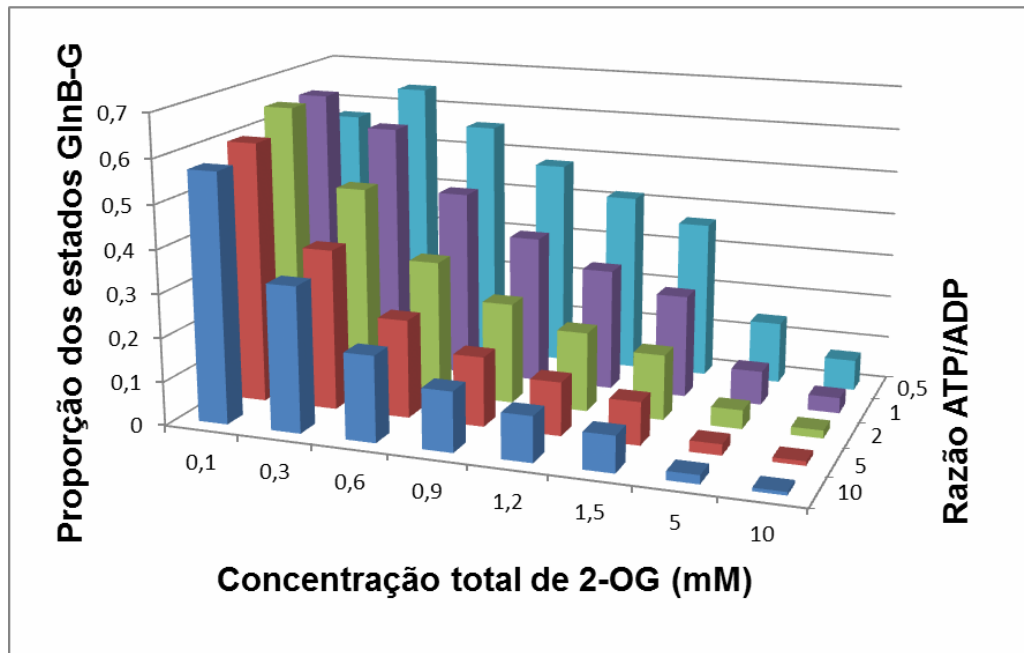


FIGURA 17 - EFEITO DA RAZÃO ATP/ADP NAS PROPORÇÕES DOS ESTADOS GlnB-G EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2-OG. Os estados GlnB-G são os estados em que uma única molécula de 2-OG está ligada à GlnB e são estados que promovem atividade AT da ATase e atividade de fosfatase da NtrB. GlnB em concentração de 1 μ M. FONTE: O autor (2013)

6.3.2 Fração de GlnB com pelo menos uma molécula de ADP ligada

A fração de GlnB com pelo menos uma molécula de ADP ligada é dada pela soma dos estados PD, PD₂, PD₃, PTD, PT₂D, PTD₂, PTGD, PTGD₂, PT₂GD e PT₂G₂D (FIGURA 6), deste ponto em diante estes estados serão referidos como “estados GlnB-D₁₋₃”. Como esperado, a fração dos estados GlnB-D₁₋₃ decaiu com o aumento da concentração de ATP quando simulações foram realizadas usando concentrações de ADP tanto baixas (0,3 mM) como altas (3 mM) (FIGURA 18). A concentração total de nucleotídeos não afetou significativamente a proporção dos estados GlnB-D₁₋₃ em concentrações de 0,1 mM de 2-OG ou 1,4 mM de 2-OG (FIGURA 19). Entretanto, a redução da razão ATP/ADP aumentou a proporção dos estados GlnB-D₁₋₃ (FIGURA 19). Interessantemente, mudanças na concentração de 2-OG tiveram um efeito relativamente baixo na proporção dos estados GlnB-D₁₋₃ (FIGURA 20). Consequentemente, a proporção de estados GlnB-D₁₋₃ é bem responsiva a razão ATP/ADP, porém apenas levemente afetada pelos níveis de 2-OG.

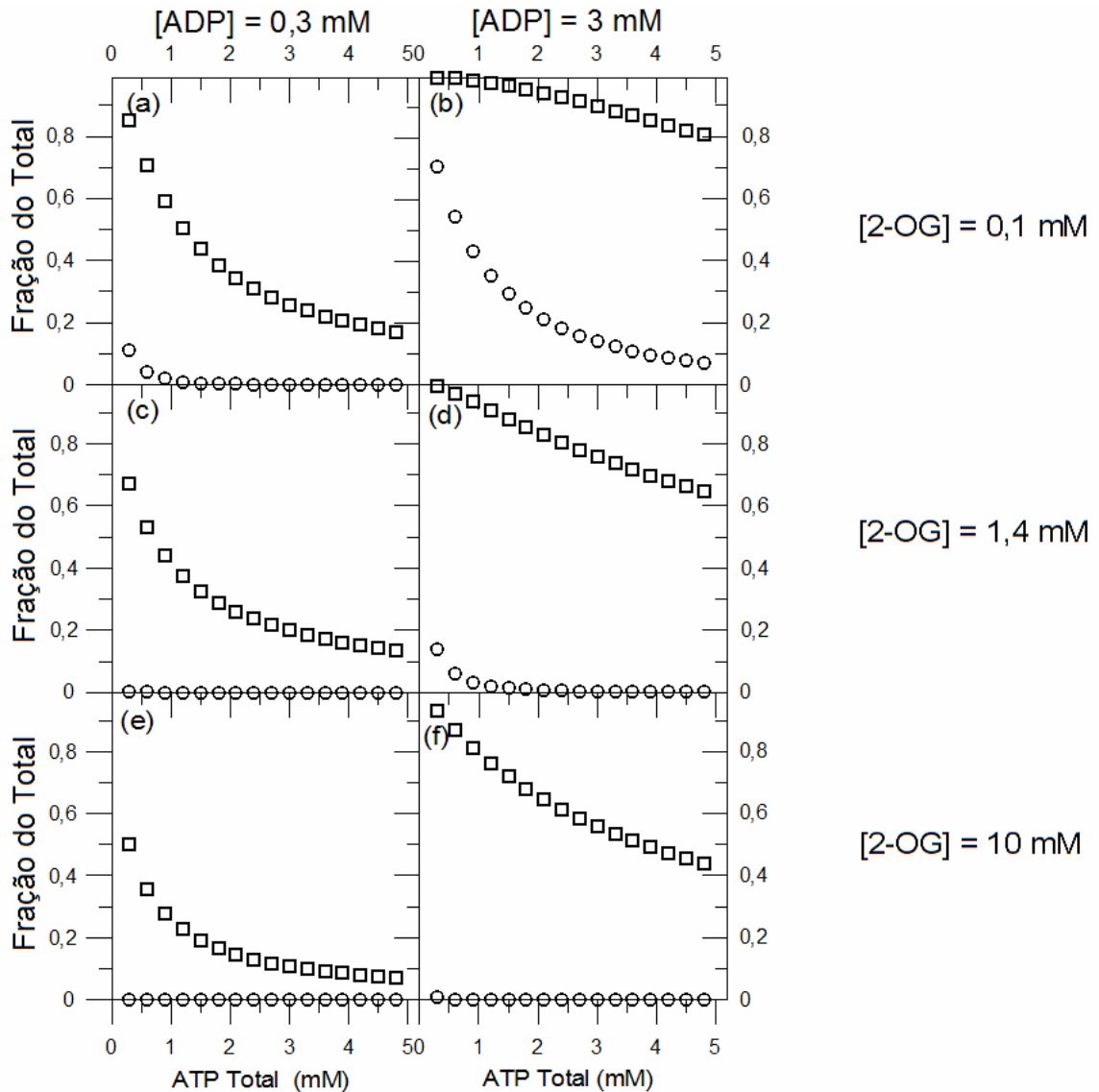


FIGURA 18 - FRAÇÕES DOS ESTADOS GlnB-D₁₋₃ E GlnB-D₃ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ADP E 2-OG EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ATP. Os gráficos foram traçados com as concentrações totais de 2-OG e ADP indicadas. Símbolos: (□), estados GlnB-D₁₋₃, (○), estados GlnB-D₃. GlnB = 1 μM. FONTE: O autor (2013)

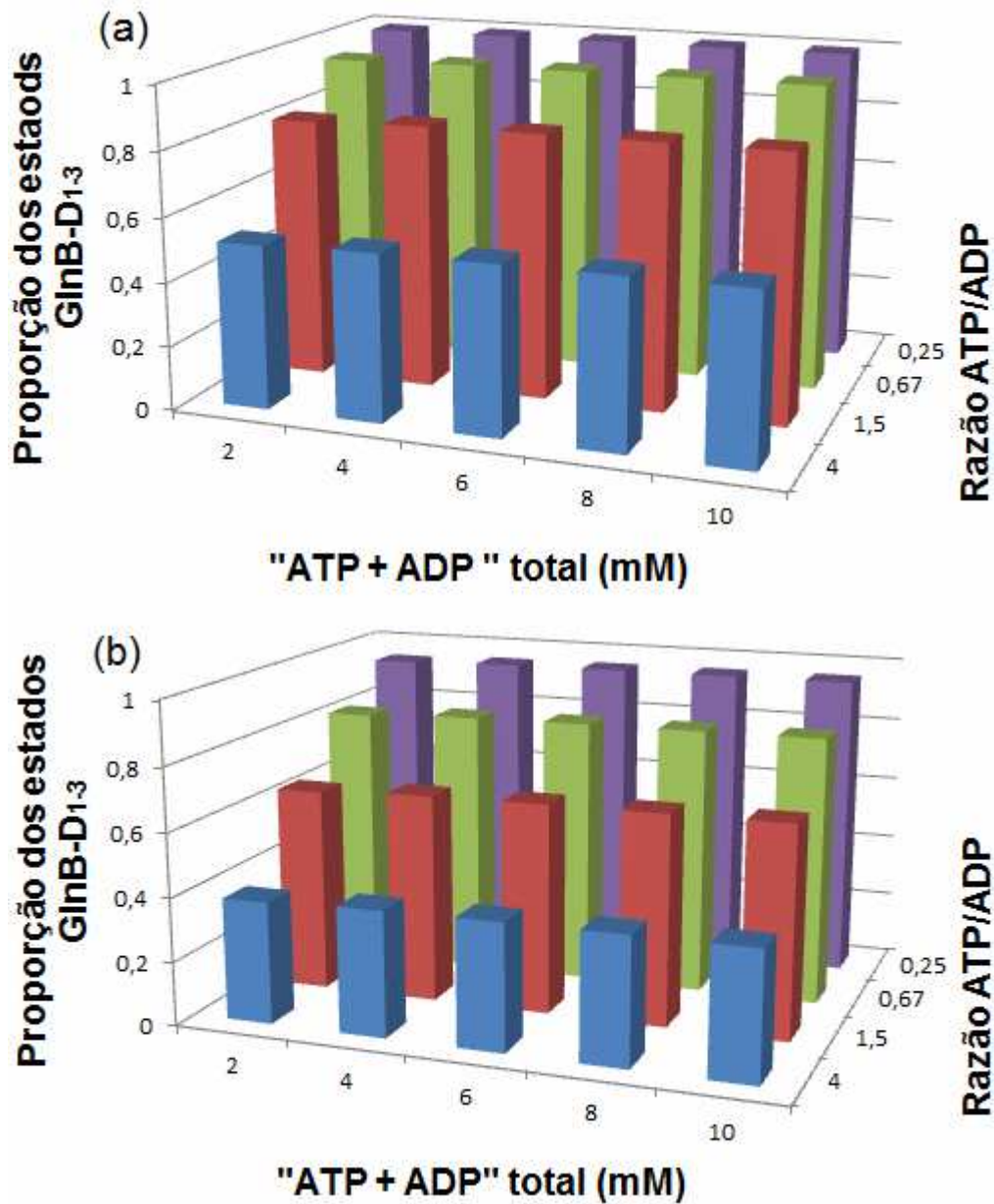


FIGURA 19 - ESTADOS GlnB-D₁₋₃ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE "ATP+ADP" TOTAL E DA RAZÃO ATP/ADP. Os estados GlnB-D₁₋₃ são os estados que apresentam ao menos uma molécula de ADP ligada à GlnB. (a) 2-OG em concentração de 0,1 mM. (b) 2-OG em concentração de 1,4 mM. Em ambos os casos GlnB = 1 μ M. FONTE: O autor (2013)

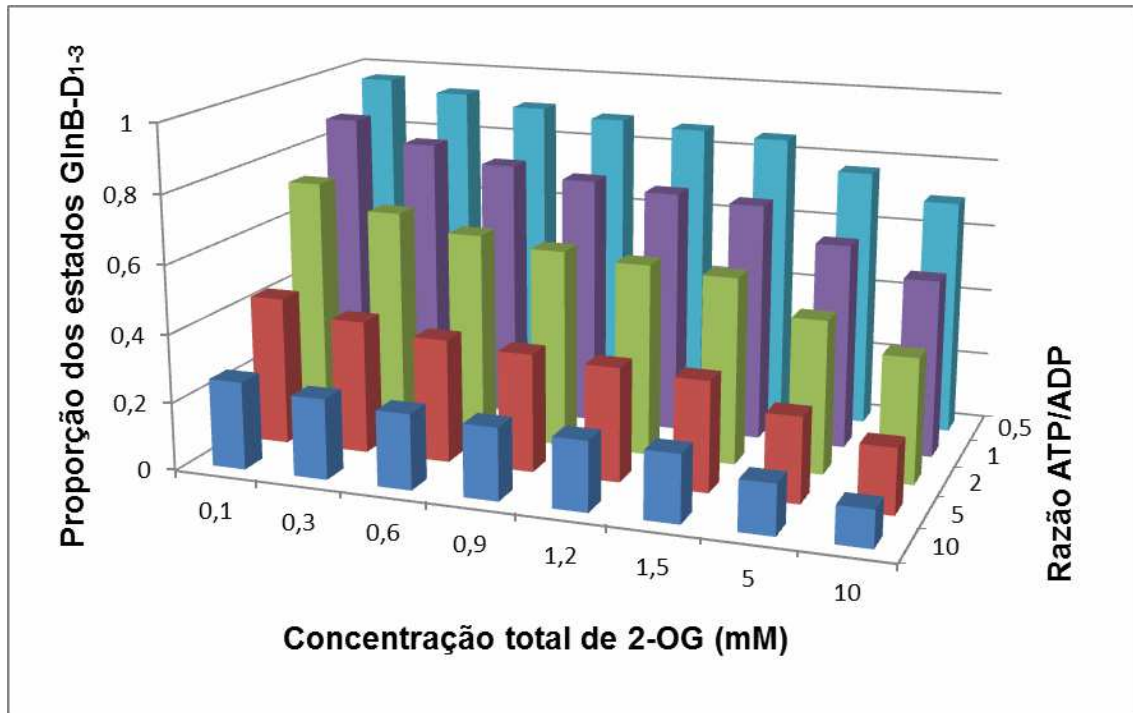


FIGURA 20 - EFEITO DA RAZÃO ATP/ADP NA PROPORÇÃO DE ESTADOS GlnB-D₁₋₃ TRAÇADO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2-OG. GlnB = 1 μ M. FONTE: O autor (2013)

6.3.3 Soma das frações GlnB-G e GlnB-D₁₋₃

Para analisar o impacto dos efetores de GlnB na regulação da atividade AT da ATase, as duas frações que promovem a atividade AT foram somadas (ou seja, estados GlnB-G + estados GlnB-D₁₋₃, tomando o cuidado de somar os estados em comum uma única vez), e doravante tal soma será denominada por “estados GlnB-AT”. Reduções tanto da razão ATP/ADP quanto da concentração de 2-OG aumentaram a fração dos estados GlnB-AT significativamente (FIGURA 21). Em outras palavras, a inativação da GS pelo complexo ATase-GlnB será maximizada quando ambas a razão ATP/ADP e a concentração de 2-OG forem baixas.

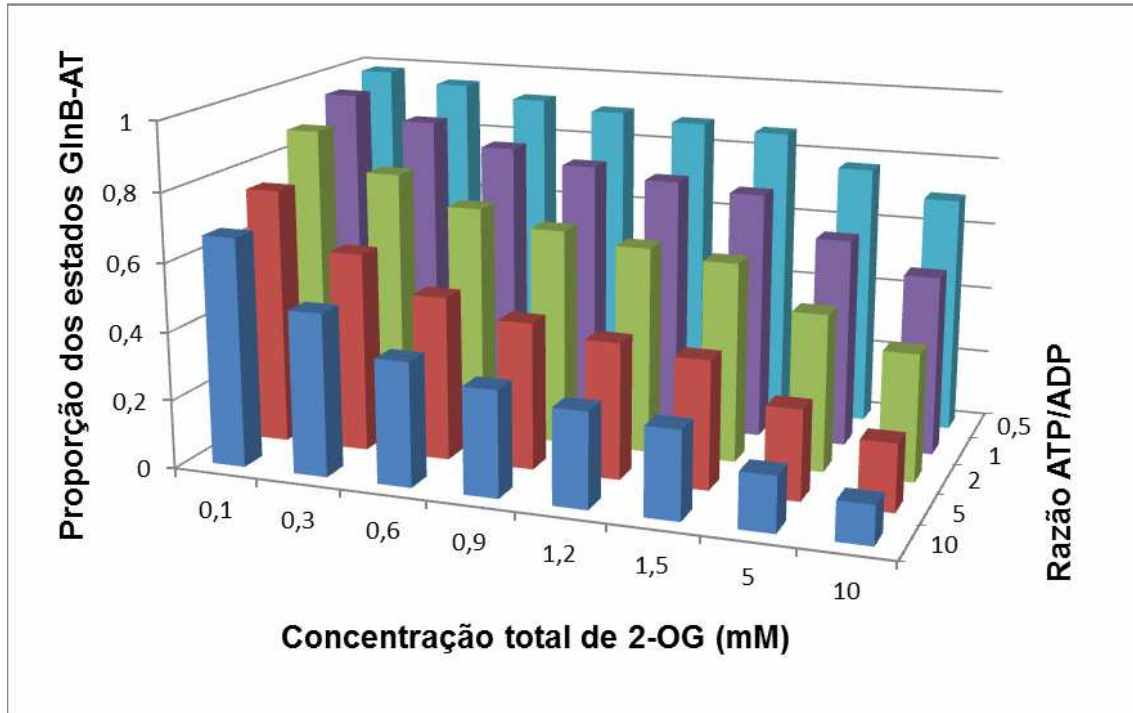


FIGURA 21 - EFEITO DA RAZÃO ATP/ADP NA PROPORÇÃO DE ESTADOS GlnB-AT TRAÇADO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2-OG. GlnB = 1 μ M. FONTE: O autor (2013)

6.4 URIDILILAÇÃO

6.4.1 Relação entre glutamina e K_U

Tabela 7 mostra os valores de K_U obtidos no ajuste do modelo de uridililação aos dados experimentais de Jiang e Ninfa (2011) de concentração de glutamina e do nível de uridililação médio de GlnB. Quando a concentração de glutamina é igual a zero, todas as subunidades de GlnB estão uridililadas (TABELA 7). Quanto maior a concentração de glutamina (ou seja, quanto maior o K_U), menor é o nível de uridililação de GlnB.

TABELA 7 - RELAÇÃO ENTRE K_U E GLUTAMINA EM FUNÇÃO DO NÍVEL DE URIDILAÇÃO DE GlnB NO EQUILÍBRIO

Uridilação por trímero de GlnB	[Glutamina] (mM)	K_U^*	$\log_{10} K_U$
3	0	0**	
2,89	0,1	0,0014	-2,85387
2,76	0,2	0,0035	-2,45593
2,35	0,3	0,018	-1,74473
2,13	0,4	0,039	-1,40894
1,91	0,5	0,085	-1,07058
1,62	0,6	0,19	-0,72125
1,26	0,8	0,4	-0,39794
1,04	1	0,58	-0,23657
0,86	1,2	0,79	-0,10237
0,66	2	1,15	0,060698
0,46	10	1,8	0,255273

FONTE: O autor (2013) com dados de uridilação e glutamina extraídos de Jiang e Ninfa (2011). Para este experimento, Jiang e Ninfa (2011) mantiveram as concentrações totais de ATP, 2-OG e GlnB fixas em 1000 μ M, 100 μ M e 0,5 μ M, respectivamente.

* Valores de K_U obtidos conforme seção 4.6.

** Na realidade, K_U tendendo a zero e, por consequência, uridilação por trímero tendendo a 3.

A Figura 22 mostra a relação entre a concentração de glutamina e K_U . O ajuste da equação de Hill (Eq. (13)) a estes dados resultou em valores de 1,8, 2,28 e 2,28 para b_1 , b_2 e n , respectivamente. O alto valor de n encontrado corresponde a uma resposta de ultrasensibilidade entre glutamina e K_U (BLÜTHGEN *et al.*, 2007). Perfis de ultrasensibilidade são caracterizados por possuírem faixas bem distintas: uma onde variações de um sinal praticamente não geram mudanças de resposta e uma onde pequenas variações do sinal geram uma grande mudança na resposta do sistema. Neste caso, variações na concentração de glutamina entre 3 e 10 mM têm uma influência bem pequena no valor de K_U , já variações na concentração de glutamina entre 1 e 3 mM geram grandes alterações nos valores de K_U (FIGURA 22).

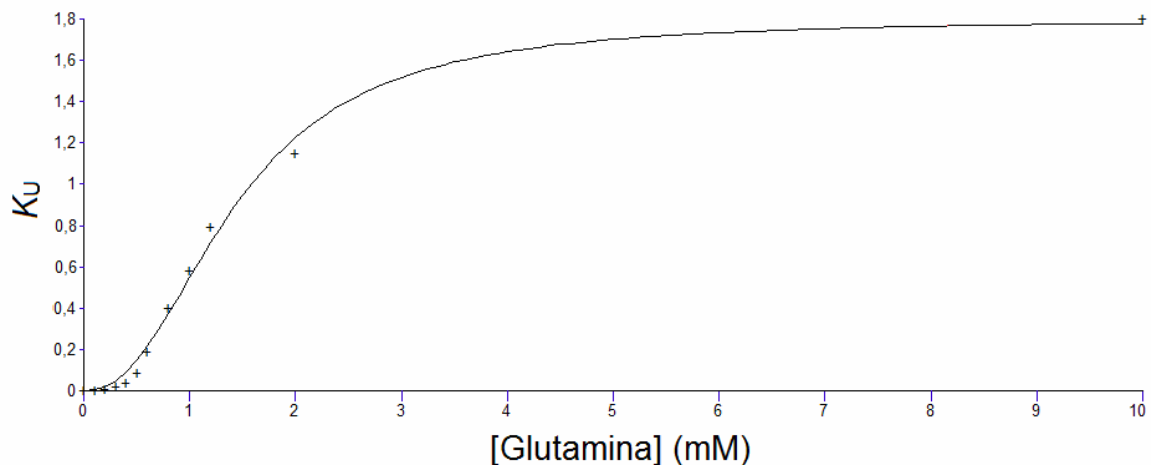


FIGURA 22 - RELAÇÃO ENTRE GLUTAMINA E K_U . As concentrações totais de ATP, 2-OG e GlnB foram mantidas fixas em 1000 μM , 100 μM e 0,5 μM , respectivamente. Símbolos: (+), correlação entre glutamina e K_U apresentada na Tabela 7. A curva representa o ajuste dos dados (+) à Eq. (13). FONTE: O autor (2013)

6.4.2 Predições dos estados conformacionais de GlnB incluindo uridililação

A disponibilidade de uma equação que fornece K_U em função da concentração de glutamina torna possível o cálculo dos estados de PII em função da concentração de glutamina. A Figura 23 apresenta a variação no perfil de ligação dos efetores ATP, ADP e 2-OG à GlnB, na medida em que o valor da concentração de glutamina muda (concentração de glutamina na faixa milimolar). A diminuição da concentração de glutamina resulta em maior uridililação de GlnB e isto faz com que o número de moléculas de ATP e 2-OG ligadas por trímico aumentem (FIGURA 23). Isto ocorre devido ao deslocamento do equilíbrio para os estados que apresentam uridililação. Como estes estados apresentam predominância de ATP e 2-OG ligado (FIGURA 8), a quantidade destes efetores ligados à GlnB aumenta. A concentração de ADP ligado diminui porque, proporcionalmente, poucos estados uridililados contêm ADP ligado.

Em concentrações altas de ADP (FIGURA 23C e FIGURA 23D), a variação da concentração de glutamina exerce uma influência bem maior na quantidade de ADP ligado se comparado com as condições em que a concentração de ADP é baixa (FIGURA 23A e FIGURA 23B). Como já visto anteriormente, a razão ATP/ADP influencia a atividade de GlnB. A glutamina também deverá influenciar na interação

de GlnB com ATase e NtrB, já que variações na concentração de glutamina podem alterar as quantidades de ATP e ADP ligados, além de alterar o estado de uridililação de GlnB.

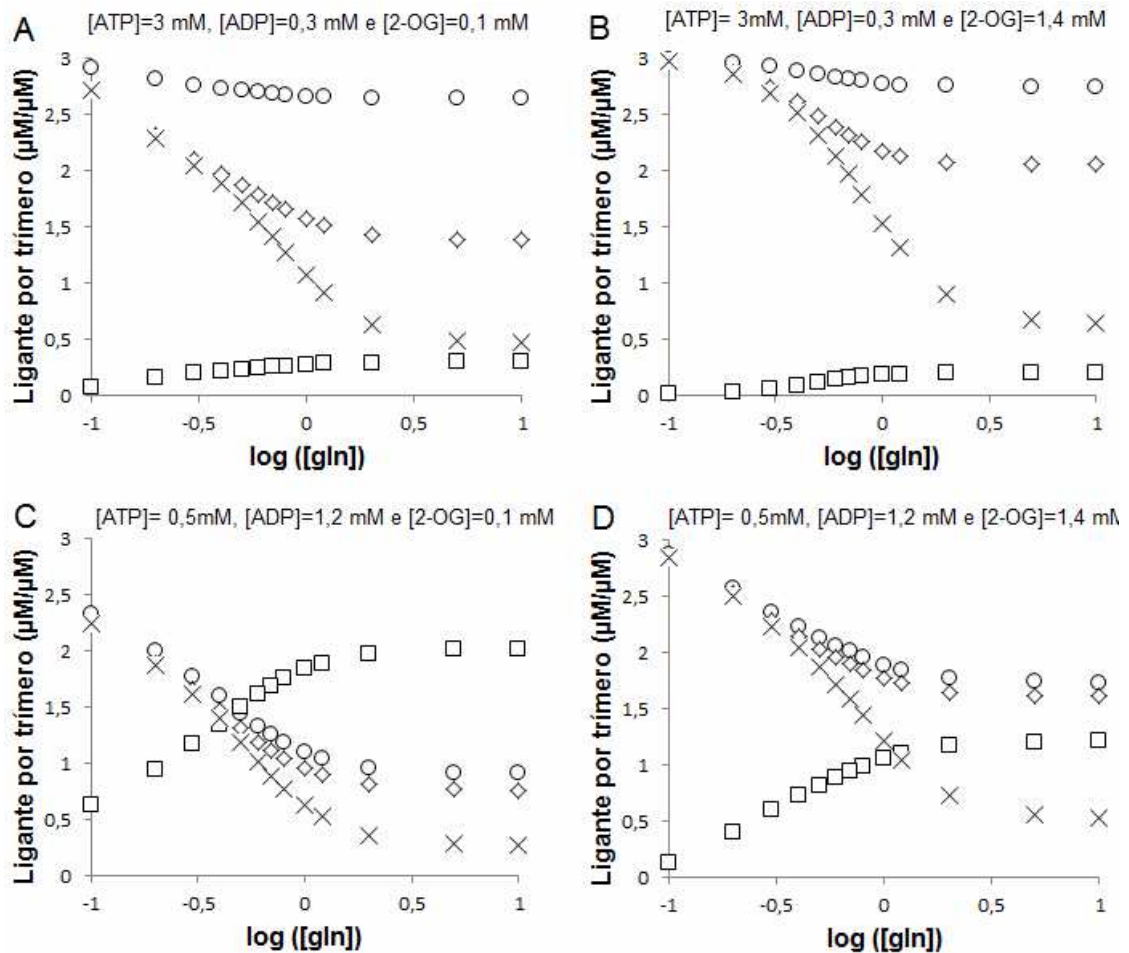


FIGURA 23 - VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE EFETORES LIGADOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA. A) ATP total em 3 mM, ADP total em 0,3 mM e 2-OG total em 0,1 mM. B) ATP total em 3 mM, ADP total em 0,3 mM e 2-OG total em 1,4 mM. C) ATP total em 0,5 mM, ADP total em 1,2 mM e 2-OG total em 0,1 mM. D) ATP total em 0,5 mM, ADP total em 1,2 mM e 2-OG total em 1,4 mM. Em todos os gráficos GlnB = 1 μM. Símbolos: [gln], concentração de glutamina na faixa milimolar; (◇), 2-OG ligado; (□), ADP ligado; (○), ATP ligado; (×), nível de uridililação médio de GlnB. FONTE: O autor (2013)

Para efeito de comparação, o cálculo da proporção dos estados GlnB-AT em função da concentração de 2-OG e da razão ATP/ADP foi feito levando em conta uridililação quando a concentração de glutamina é de 1 mM (FIGURA 24). Comparando-se a Figura 24 com a Figura 21 fica bem evidente que concentração de glutamina irá afetar a proporção dos estados GlnB-AT. A forma da superfície fica semelhante, porém ocorre uma redução drástica na proporção dos estados GlnB-AT na Figura 24. Para efeito de comparação, a proporção dos estados GlnB-AT em

concentrações de 2-OG de 0,1 mM e razão ATP/ADP de 0,5 é de quase 100% na Figura 21 e de apenas cerca de 40% na Figura 24.

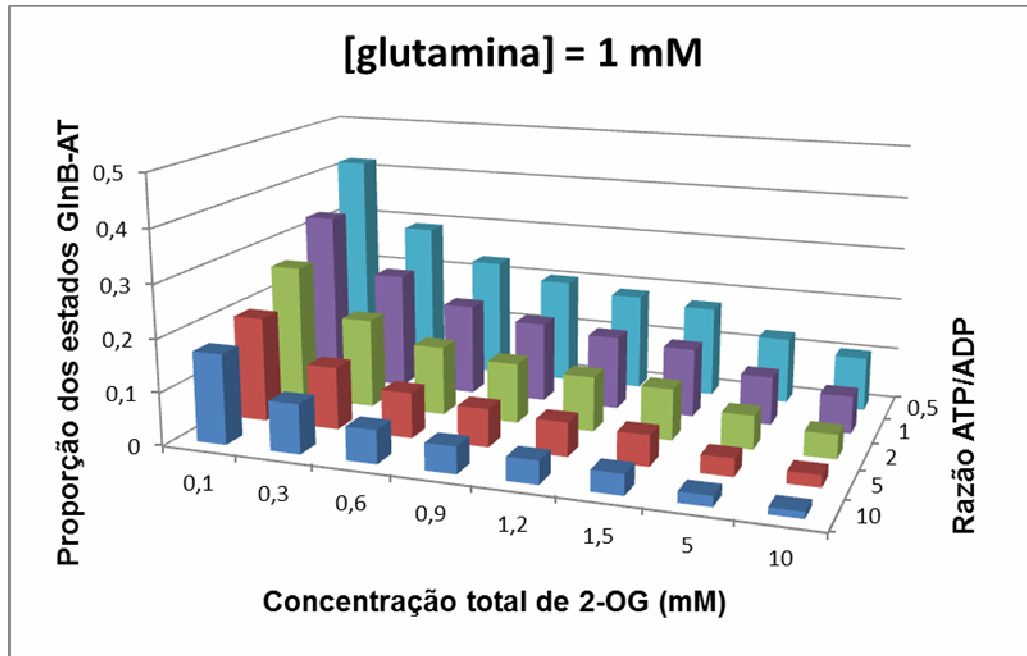


FIGURA 24 - EFEITO DA RAZÃO ATP/ADP NA PROPORÇÃO DE ESTADOS GlnB-AT TRAÇADO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 2-OG CONSIDERANDO URIDILILAÇÃO. Concentração de GlnB igual a 1 μ M e concentração de glutamina igual a 1 mM. FONTE: O autor (2013)

Para verificar como a variação da concentração de glutamina afeta as proporções de estados com uma, duas ou três uridililações, a mesma simulação foi realizada, porém, desta vez, as concentrações individuais dos estados uridililados foram verificadas (FIGURA 25). Em valores de concentração de glutamina abaixo de 0,1 mM (ou seja, $\log [gln] < -1$) a maior parte de GlnB estará no estado triuridililado em condições de concentração baixa de ADP (FIGURA 25A e FIGURA 25B). Porém, quando a concentração de ADP é alta (1,2 mM) e 2-OG é baixa (0,1 mM) a presença de estados triuridililados é baixa, independente da concentração de glutamina (FIGURA 25C). Já em concentrações altas de ADP (1,2 mM) e altas de 2-OG (1,4 mM), valores de concentração de glutamina baixos (inferiores a 0,2 mM) voltam a favorecer a presença de estados triuridililados (FIGURA 25D). Independente das condições, as curvas dos estados uridililados apresentam comportamentos semelhantes. A curva referente aos estados triuridililados sofre um rápido decréscimo em razão do aumento da concentração de glutamina. Já a curva dos estados diuridililados inicialmente aumenta com aumento da concentração de

glutamina, chegando próximo ao seu valor máximo quando a fração dos estados triuridilados representa cerca de 10% da fração total. Em seguida, também sofre um rápido decréscimo em função do aumento da concentração de glutamina. Na medida em que a concentração dos estados diuridilados decresce, a concentração de estados monouridilados inicialmente aumenta, atingindo seu pico quando a fração de estados diuridilados atinge, aproximadamente, 30% do total. Depois do pico, o decaimento da concentração dos estados monouridilados em função do aumento da concentração de glutamina é bem mais suave do observado para os outros estados uridilados. Desta maneira, mesmo em concentrações altas de glutamina, a fração de estados monouridilados continua sendo significativa.

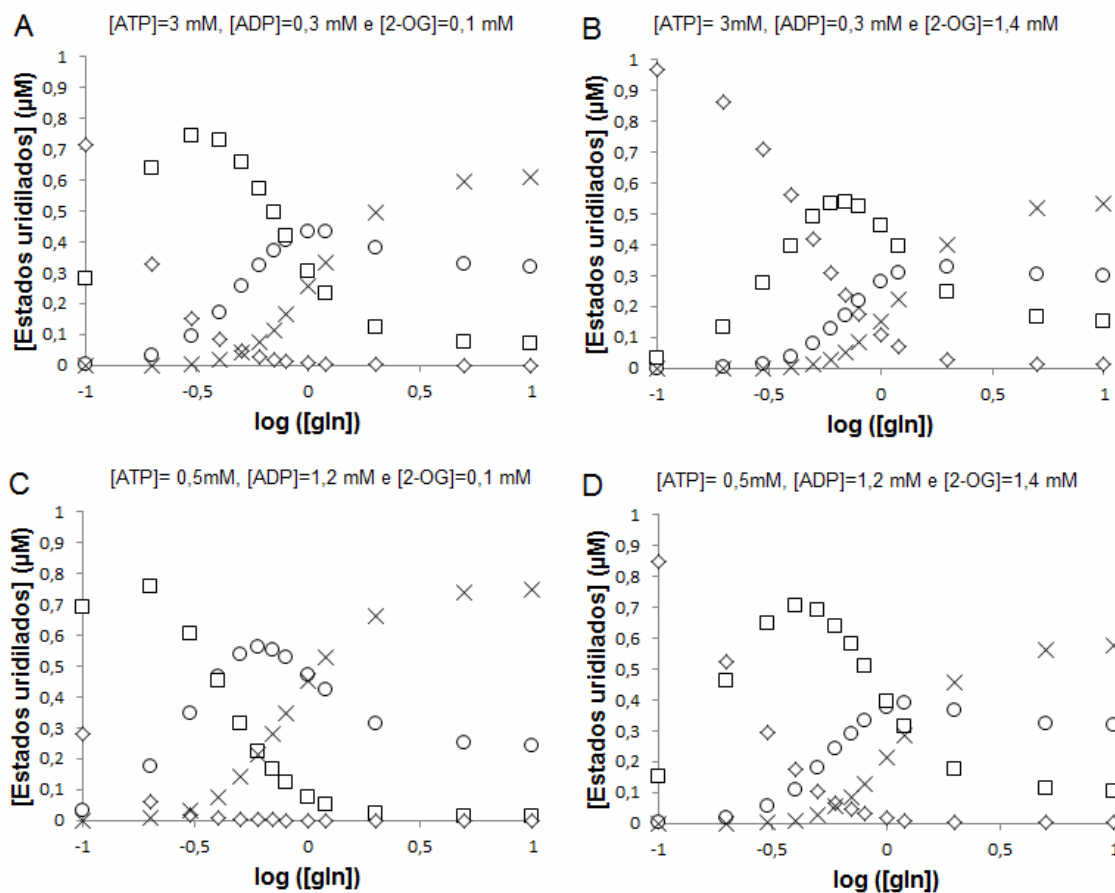


FIGURA 25 - VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE ESTADOS URIDILADOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA. A) ATP total em 3 mM, ADP total em 0,3 mM e 2-OG total em 0,1 mM. B) ATP total em 3 mM, ADP total em 0,3 mM e 2-OG total em 1,4 mM. C) ATP total em 0,5 mM, ADP total em 1,2 mM e 2-OG total em 0,1 mM. D) ATP total em 0,5 mM, ADP total em 1,2 mM e 2-OG total em 1,4 mM. Em todos os gráficos $GlnB = 1 \mu M$. Símbolos: [gln], concentração de glutamina; (◇), soma dos estados triuridilados; (□), soma dos estados diuridilados; (○), soma dos estados monouridilados; (×), soma dos estados desuridilados. FONTE: O autor (2013)

Para verificar como diferentes razões ATP/ADP afetam o nível de uridililação médio por trîmero de GlnB, uma simulação foi realizada variando-se o valor de concentração de glutamina em diferentes razões ATP/ADP (FIGURA 26). Apesar de diferentes concentrações de ATP e ADP alterarem a concentração dos diferentes estados uridililados (ou seja, dos estados mono, di e triuridililados) (FIGURA 25), a razão ATP/ADP teve pouca influência no nível de uridililação médio dos trîmeros de GlnB (FIGURA 26). Para o controle da atividade AR da ATase, o que importa é a concentração de subunidades uridililadas de GlnB (JIANG; NINFA, 2011), ou seja, teoricamente uma concentração de 1,5 mM de GlnB monouridililada acarretaria em uma mesma atividade AR que uma concentração de 0,5 mM de GlnB triuridililada. Já para o controle da atividade AT, as concentrações específicas de estados mono, di e triuridililados são importantes (JIANG; NINFA, 2011). Esta simulação pode indicar que a razão ATP/ADP só tenha importância para o controle da atividade AT da ATase (como demonstrado na seção 6.3.3) e não para o controle da atividade AR, ou seja, para a atividade AR não é importante se os nucleotídeos ligados à GlnB são ATP ou ADP. Por exemplo, se esta suposição estiver correta, os estados PT₃G-UMP e PTGD₂-UMP da Figura 8 acarretariam em um mesmo efeito sobre a atividade AR.

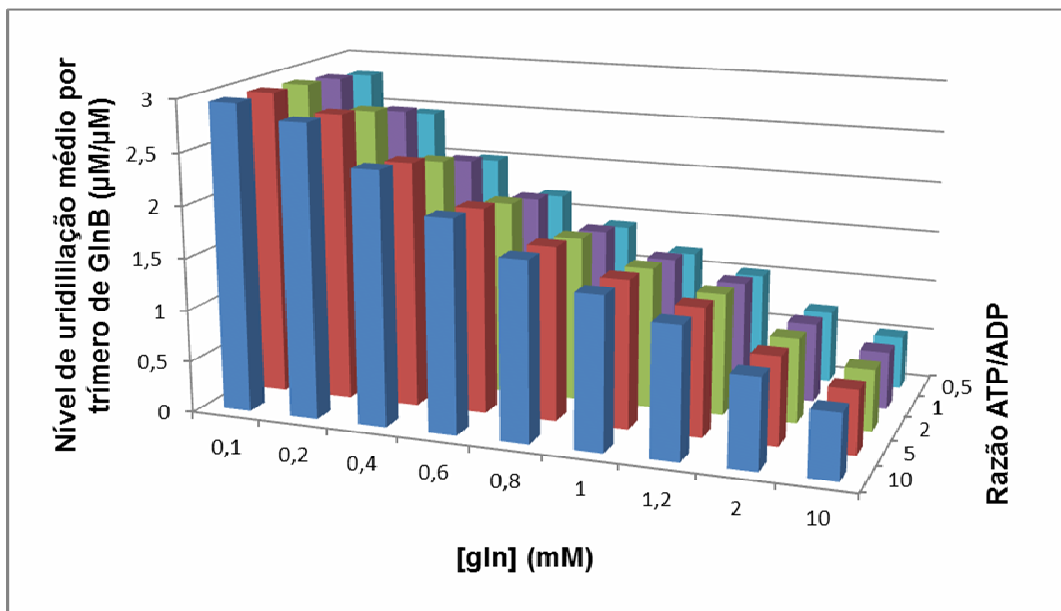


FIGURA 26 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA RAZÃO ATP/ADP E DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA NO NÍVEL DE URIDILILAÇÃO DE GlnB. A concentração de 2-OG de 1 mM e de GlnB de 1 µM. FONTE: O autor (2013)

A concentração de 2-OG influenciou tanto as concentrações dos estados uridililados (FIGURA 25) quanto o nível de uridililação médio do trímero de GlnB (FIGURA 27). O efeito de mudanças na concentração de 2-OG na variação absoluta do nível de uridililação de GlnB é significativa para concentrações de glutamina entre 0,2 e 2 mM, mas pequena para concentrações extremas (0,1 e 10 mM) (FIGURA 27).

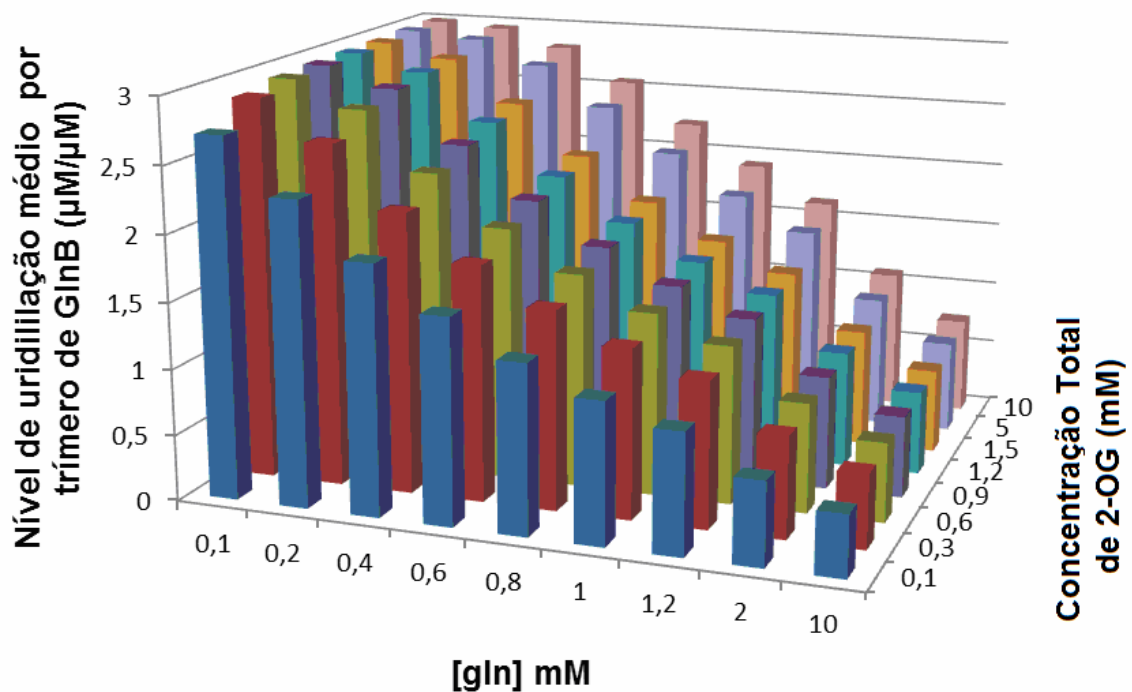


FIGURA 27 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OG E DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA NO NÍVEL DE URIDILILAÇÃO DE GlnB. Concentração de ATP de 3 mM, de ADP de 0,3 mM e de GlnB de 1 µM. FONTE: O autor (2013)

7 DISCUSSÃO

O modelo apresentado é o primeiro modelo que considera a ligação simultânea de ATP, ADP e 2-OG à PII. Além disso, o modelo também considera a uridililação de GlnB por meio de uma correlação entre a concentração de glutamina e uma constante de pseudo-equilíbrio relacionada à uridililação de GlnB. Desta maneira, foi possível calcular as concentrações dos diferentes estados de GlnB em função das concentrações de ATP, ADP, 2-OG e glutamina e, portanto, simular uma variedade de condições intracelulares, de plenitude a escassez de nutrientes, com o intuito de investigar como GlnB irá interagir com ATase e NtrB.

7.1 COMPARAÇÃO DO MODELO M3 COM A ABORDAGEM DE MODELAGEM DE JIANG E NINFA (2007)

O modelo escolhido, M3, é o primeiro modelo para PII capaz de prever as concentrações de efetores ligados e as concentrações dos estados quando os três efetores (ATP, ADP e 2-OG) estão presentes. Quando somente um efetor está presente (ATP ou ADP), M3 simplifica, gerando a mesma equação usada por Jiang e Ninfa (2007) (Eq. (1)). Já que a ligação de 2-OG depende de ATP (FOKINA *et al.*, 2010a), o modelo de Jiang e Ninfa (2007) pode ser usado apenas para descrever a ligação de 2-OG em ausência de ADP e em concentrações saturantes de ATP, de modo que todas as PII estarão na forma PT_3 antes da adição de 2-OG. Entretanto, no experimento realizado com o intuito de medir as constantes de dissociação para 2-OG, Jiang e Ninfa (2007) não explicam se o objetivo era ter GlnB saturada por ATP em seu experimento.

É possível usar o modelo desenvolvido no presente trabalho para explorar o significado das constantes de dissociação para 2-OG que foram relatadas por Jiang e Ninfa (2007). A seguinte equação pode ser derivada da Eq. (A2c) (APÊNDICE 2), considerando a concentração de ADP igual a zero:

$$\frac{[G]_B}{[P]_T} = \frac{\left(\frac{[T][G]}{K_{T_1}K_{G_1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}} + 2 \left(\frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}} \right) + 3 \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}} \right)}{\left(\frac{[T]}{K_{T_1}} + \frac{[T]^2}{K_{T_1}K_{T_2}} + \frac{[T]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}} + \frac{[T][G]}{K_{T_1}K_{G_1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}} + 1 \right)} \quad (14)$$

Rearranjando os termos da equação para que ela fique no formato da Eq. (1) de Jiang e Ninfa (2007), tem-se:

$$[G]_B = \frac{[P]_T \left(\frac{(K_{T_2}K_{T_3}K_{G_2}K_{G_3}[T] + K_{T_3}K_{G_2}K_{G_3}[T]^2 + K_{G_2}K_{G_3}[T]^3)}{[T]^3} [G] + 2 \frac{(K_{T_3}K_{G_3}[T]^2 + K_{G_3}[T]^3)}{[T]^3} [G]^2 + 3[G]^3 \right)}{\left(\frac{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3} + K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}[T] + K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}[T]^2}{[T]^3} + \frac{K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}[T]^3}{[T]^3} + \frac{(K_{T_2}K_{T_3}K_{G_2}K_{G_3}[T] + K_{T_3}K_{G_2}K_{G_3}[T]^2 + K_{G_2}K_{G_3}[T]^3)}{[T]^3} [G] + \frac{(K_{T_3}K_{G_3}[T]^2 + K_{G_3}[T]^3)}{[T]^3} [G]^2 + [G]^3 \right)} \quad (15)$$

Por analogia da Eq. (15) com a Eq. (1), tem-se que:

$$K_{x1} = \frac{K_{G_1}(K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3} + K_{T_2}K_{T_3}[T] + K_{T_3}[T]^2 + [T]^3)}{K_{T_3}[T](K_{T_2} + [T])} \quad (16a)$$

$$K_{x2} = \frac{K_{T_3}K_{G_2}(K_{T_2} + [T])}{[T](K_{T_3} + [T])} \quad (16b)$$

$$K_{x3} = \frac{K_{G_3}(K_{T_3} + [T])}{[T]} \quad (16c)$$

Analisando as Eqs. (16a) a (16c), fica evidente que as constantes usadas por Jiang e Ninfa (2007) para o cálculo das constantes de dissociação de 2-OG são funções da concentração de ATP livre usado no experimento. Em outras palavras, as constantes de dissociação que Jiang e Ninfa (2007) obtiveram para ligação de 2-OG são valores aparentes, já que elas dependem da concentração de ATP. M3 não apresenta tal limitação.

Também vale ressaltar que Jiang e Ninfa (2007) reportaram conjuntos de K_d para ATP em diferentes concentrações de 2-OG que foram usadas, sem indicar que os valores reportados eram, de fato, valores aparentes. As seguintes expressões são as correspondentes do modelo deste trabalho para as constantes aparentes da ligação de ATP, para experimentos feitos em presença de 2-OG e ausência de ADP, do trabalho de Jiang e Ninfa (2007):

$$K_{x1} = \frac{K_{T1}K_{T3}K_{G1}(K_{G1}K_{G2} + K_{G2}[G] + [G]^2)}{(K_{G1} + [G])(K_{T3}K_{G1}K_{G2} + K_{T3}K_{G2}[G] + K_{T3}[G]^2)} \quad (17a)$$

$$K_{x2} = \frac{K_{T2}K_{G2}(K_{G1} + [G])}{K_{G1}K_{G2} + K_{G2}[G] + [G]^2} \quad (17b)$$

$$K_{x3} = \frac{K_{G3}(K_{T3}K_{G1}K_{G2} + K_{T3}K_{G2}[G] + K_{T3}[G]^2)}{K_{G1}K_{G2}K_{G3} + K_{G2}K_{G3}[G] + K_{G3}[G]^2 + [G]^3} \quad (17c)$$

Logo, as constantes de dissociação para ATP reportadas por Jiang e Ninfa (2007) não são os valores verdadeiros: dependem da concentração de 2-OG usada no experimento. No caso de M3 todos K_d 's são constantes reais, não constantes aparentes. Jiang e Ninfa (2007) relatam que ocorre diminuição nos valores dos K_d 's da ligação de ATP à GlnB quando 2-OG está presente. Como foi mencionado na seção 6.2, se for levada em conta a hipótese de que o 2-OG só pode se ligar à GlnB após a ligação de ATP (FOKINA *et al.*, 2010a), a presença de 2-OG gera dez novos estados de ligação de GlnB, o que resultaria em um deslocamento do equilíbrio para estes novos estados. Como estes novos estados apresentam ATP ligado, a quantidade de ATP ligado aumenta, mesmo sem mudança nos valores dos K_d 's para a ligação de ATP. Isto fica mais claro ao se fazer uma análise das Eqs. (17a) a

(17c). A concentração de 2-OG está elevada a uma potência maior no denominador do que no numerador, ou seja, valores altos de $[G]$ irão fazer com que os valores das constantes aparentes diminuam. Na Tabela 8 seguem os valores das constantes aparentes K_{X1} , K_{X2} e K_{X3} das Eqs. (17a) a (17c) em função de variações da concentração de 2-OG usando os valores de K_{T1} , K_{T2} , K_{T3} , K_{G1} , K_{G2} e K_{G3} listados na Tabela 5 para M3 (no caso de M3 $K_{T2} = K_{T3}$).

TABELA 8 - VALORES DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO APARENTES DE ATP EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-OG

Concentração de 2-OG (μM)	Valores das constantes de dissociação aparentes da ligação de ATP (μM)		
	K_{X1}	K_{X2}	K_{X3}
0	46	234	234
100	4,6	143,9	232,7
300	1,6	77,8	227,3
600	0,8	46,0	218,6
900	0,6	32,6	210,2
1200	0,4	25,3	202,4
1500	0,3	20,6	195,0
5000	0,1	6,6	136,8
10000	0,05	3,3	95,9

FONTE: O autor (2013)

Com relação aos ajustes dos modelos, Jiang e Ninfa (2007) obtiveram um bom ajuste para dados experimentais com ATP como único ligante pela aplicação de um modelo com duas classes de sítios de ligação para ATP (ou seja, $K_{X2} = K_{X3}$ na Eq. (1)). Como neste trabalho M3, que considera duas classes de sítios para ATP, também mostrou bons resultados, pode ser levantada a hipótese de que a ligação da primeira molécula de nucleotídeo seja responsável por uma mudança na conformação da GlnB, fazendo com que a ligação subsequente de nucleotídeos seja dificultada. Para confirmação desta hipótese, seria necessário determinar estruturas de GlnB com uma, duas e três nucleotídeos ligados por trímero de GlnB.

Uma outra melhoria trazida por M3 é o de que ele pôde ser facilmente estendido para descrever a uridililação de GlnB. Com o modelo de Jiang e Ninfa (2007) isto não seria possível pois, para isso, é necessário que o modelo possa reconhecer e diferenciar todos os efetores.

7.2 CONTRIBUIÇÕES DO MODELO M3 PARA INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE SINALIZAÇÃO DE PII

M3 apresenta suposições chave que são diferentes das propostas por Jiang e Ninfa (2007) com relação à ligação de efetores à GlnB. Em primeiro lugar, M3 apresenta apenas duas classes de sítios para ligação de ATP enquanto Jiang e Ninfa (2007) sugeriram que existem três classes. Em segundo lugar, M3 assume que a ligação de ATP à GlnB dificulta a ligação de ADP, e vice-versa, enquanto o trabalho de Jiang e Ninfa (2007) não sugere que a ligação de um destes nucleotídeos afeta a afinidade de GlnB pelo outro. A incorporação desta hipótese em M3 foi a principal razão para que M3 tenha apresentado um erro de ajuste menor que M1. Apesar destas diferenças, as simulações realizadas com M3 suportam algumas hipóteses previamente levantadas por Jiang e Ninfa (2009) com relação à GlnB de *E. coli*, que seriam: 1) GlnB pode ter ADP e ATP ligados simultaneamente em um mesmo trîmero; 2) Sob condições fisiológicas o trîmero de GlnB terá seus três sítios de ligação de nucleotídeos ocupados por moléculas de ATP e ADP; e 3) 2-OG antagoniza a ligação de ADP à GlnB através do favorecimento da ligação do nucleotídeo competidor ATP (FIGURA 14d).

Por outro lado, este trabalho sugere duas novas idéias que são diferentes de hipóteses levantadas anteriormente. Em primeiro lugar, foi a primeira vez em que se sugeriu que a cooperatividade negativa que ocorre com a ligação sucessiva de moléculas de ATP se deve a uma mudança de conformação e que esta mudança também dificulta a ligação de ADP ao trîmero. Em segundo lugar, o esquema descrito pelo modelo, representado pela Figura 6, difere significativamente do esquema proposto por Jiang e Ninfa (2009). O esquema destes autores contempla 56 estados de PII, porque permite que o 2-OG se ligue tanto a uma subunidade sem nucleotídeo ligado, quanto a subunidades com ADP ligado. Porém, os próprios autores verificaram que em ausência de ATP e presença de ADP, 2-OG não se liga à PII (JIANG; NINFA, 2007). O esquema apresentado na FIGURA 6 só permite que o 2-OG se ligue a uma subunidade que apresente ATP ligado; isto elimina 36 dos estados hipotéticos propostos por Jiang e Ninfa (2009). Evidências estruturais são requeridas para elucidar os tipos de mudança que ocorrem na proteína em função

da ligação subsequente de nucleotídeos e quais estados de ligação são realmente possíveis. Um método bastante usado para determinação da estrutura tridimensional de proteínas é a cristalização. Entretanto, a determinação da estrutura de uma macromolécula não é uma tarefa fácil, pois a formação de um cristal de tamanho e qualidades adequados depende de diversos parâmetros (DRENTH, 1999).

Como mencionado na seção 7.1, com a estratégia de modelagem usada no presente trabalho foi possível estender M3 para descrever o processo de uridililação de GlnB. Desta maneira, todos os estados (hipotéticos) de GlnB podem ser considerados. Com a uridililação inclusa, o modelo é capaz de calcular as concentrações de todos os estados de GlnB em uma determinada concentração dos efetores (ATP, ADP, 2-OG e glutamina). Com isto, seria possível calcular as consequências de alterações nas concentrações destes efetores nas atividades de processos regulados por GlnB, como o processo de adenililação de GS.

O processo de uridililação pode ter sido uma etapa evolutiva das proteínas PII de proteobactérias a fim de refinar o controle da resposta do metabolismo de nitrogênio. Sem o processo de uridililação, as proteínas GlnB de *E. coli*, por exemplo, seriam incapazes de controlar a atividade AR da ATase (GlnB uridililadas são responsáveis pelo aumento desta atividade). A velocidade inicial basal da atividade AR é bem mais baixa na ausência de GlnB uridililada (JIANG; NINFA, 2011). Assim, o processo de remoção de adenilil da GS (ou seja, ativação da GS) seria muito mais demorado, o que iria retardar o processo de assimilação de amônia pela via da GS.

As PII de cianobactérias também podem sofrer modificação covalente, porém, ao invés de uridililação, ocorre fosforilação de PII. Este processo de fosforilação é controlado pelos níveis de 2-OG e ATP e não depende de glutamina (LEIGH; DODSWORTH, 2007). Como as moléculas alvo de PII em cianobactérias são diferentes das de proteobactérias, é possível que as PII de cianobactérias tenham seguido outro caminho evolutivo, devido a este tipo diferenciado de controle. Um modelo diferente, mas desenvolvido utilizando as mesmas estratégias usadas neste trabalho, seria uma ferramenta útil para explorar esta questão.

Apesar de não haver garantias de que M3 seja a forma correta de representar o sistema de interação entre PII e seus efetores, a estratégia de modelagem

apresentada é um avanço em relação às abordagens matemáticas apresentadas anteriormente.

7.3 PERSPECTIVAS COM RELAÇÃO ÀS PII

As simulações realizadas com M3 sugerem que é bem improvável que trímeros de GlnB ligados a três moléculas de ADP estejam presentes em concentrações significativas em condições fisiológicas, tanto de escassez quanto tem plenitude de nutrientes (FIGURA 18). Isto poderia explicar porque GlnK, ao invés de GlnB, foi selecionada para regular a atividade de AmtB. A interação AmtB-GlnK apresenta maior estabilidade quando o trímero de PII é ocupado por 3 moléculas de ADP, assim, inativando o transporte de amônio por AmtB (CONROY *et al.*, 2007; GRUSWITZ; O'CONNELL; STROUD, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2011). Isto sugere que a afinidade de GlnK por ADP deve ser maior que a afinidade de GlnB por ADP, de modo que seja possível a presença de GlnK-D₃ em condições fisiológicas em que o transporte de amônio não é interessante.

As simulações dos diversos estados de GlnB ajudaram a entender o resultado observado por Jiang e Ninfa (2007) de que tanto os estados GlnB-G quanto os estados GlnB-D₁₋₃ regulam a atividade AT. Por exemplo, em concentrações extremas de 2-OG de 0,1 mM e 10 mM, a razão ATP/ADP é incapaz de alterar significativamente a concentração absoluta dos estados GlnB-G (FIGURA 17). Contudo, nestes mesmos valores extremos de concentração de 2-OG, a razão ATP/ADP exerce uma grande influência nas concentrações dos estados GlnB-D₁₋₃ (FIGURA 20). Já quando a razão ATP/ADP é alta, variações na concentração de 2-OG pouco influenciam na concentração dos estados GlnB-D₁₋₃ (FIGURA 20), porém, estas variações alteram significativamente a concentração dos estados GlnB-G (FIGURA 17). Então, com a combinação destes estados (ou seja, os estados GlnB-AT), a GlnB pode responder de maneira mais eficaz através de variações nas concentrações dos efetores dentro da faixa fisiológica. Por isso, a assimilação de amônio através da GS vai ser limitada não só pela disponibilidade de 2-OG como também pela disponibilidade de energia da célula, percebida pela razão ATP/ADP.

Ou seja, quando a célula apresenta deficiência de 2-OG ou uma baixa razão ATP/ADP ou ambas, a GS seria inativada devido a alta concentração de estados GlnB-AT. Nestas situações a célula pode dar preferência para outros processos metabólicos já que a diminuição do nível de 2-OG em *E. coli* ocorre quando há esgotamento de fonte de carbono (YAN; LENZ; HWA, 2011) e deficiência de ATP quer dizer que, mesmo que seja interessante usar a via de assimilação de amônia que envolve GS, a célula não tem energia suficiente para fazer isto. Estes resultados suportam a hipótese de que as proteínas PII podem agir não só como sensores de 2-OG como também como sensores da razão ATP/ADP (JIANG; NINFA, 2007; JIANG; NINFA, 2009; FOKINA; HERRMANN; FORCHHAMMER, 2011; GERHARDT *et al.*, 2012).

Perspectivas futuras incluem o uso do modelo para fazer previsões da atividade de GS em função das concentrações de glutamina, 2-OG e da razão ATP/ADP. Para isto, dados da atividade de GS em função de diferentes concentrações de ATP, ADP, 2-OG e glutamina podem ser usados (disponíveis, inclusive, no trabalho de Jiang e Ninfa (2007)). Também seria interessante estender a aplicação do modelo para outras proteínas da família PII. Devido ao alto grau de conservação do modo de ligação de ATP, ADP e 2-OG às proteínas PII (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2012), é possível que o modelo proposto para GlnB de *E. coli* neste trabalho possa ser aplicado para proteínas PII de outros organismos. Caso o modelo não se adeque a outros tipos de PII, ao menos a estratégia de desenvolvimento do modelo pode ser seguida. A estimação das constantes de dissociação para outras proteínas PII iria requerer uma quantia significativa de trabalho experimental, similar ao reportado por Jiang e Ninfa (2007) e listado na Tabela 4. Nestes experimentos, seria interessante determinar a concentração de todos os efetores ligados no mesmo experimento quando mais de um efector está presente. Por exemplo, ao invés de se ter apenas a quantia de ATP ligado em um experimento em presença de ADP e 2-OG, ter-se-iam valores para os três efetores ligados. Isto levaria a um teste mais exigente do modelo, já que as previsões do modelo seriam comparadas com três valores ao invés de somente um valor.

A estrutura do modelo também pode ser modificada no futuro. Novas evidências estruturais podem fornecer uma base mais sólida para explicar as modificações decorrentes da ligação dos efetores às proteínas PII e da uridililação.

Novas evidências de ligação também podem gerar alterações no modelo. Por exemplo, foi considerado que a molécula de ATP não pode se desligar de GlnB caso haja uma molécula de 2-OG ligada na vizinhança da molécula de ATP. Caso seja possível a saída da molécula de ATP mesmo com a molécula de 2-OG ligada, o modelo deve ser adaptado para incluir esta possibilidade. Para que isto possa ser verificado, poderiam ser realizados experimentos com PII em condições saturantes de ATP e 2-OG. A proteína deveria ser extraída do meio e colocada em outro que apresentasse condição saturante de 2-OG e ausência de ATP. As concentrações das moléculas de ATP e 2-OG ligadas deveriam ser medidas e analisadas para verificar se é possível a saída de ATP sem que haja desligamento de 2-OG da GlnB.

8 CONCLUSÃO

A principal contribuição deste trabalho é a proposição de um modelo que leva em conta todos os ligantes que podem se ligar à PII, tanto de maneira não covalente (ATP, ADP e 2-OG) como de modo covalente (UMP). Portanto, diferente de modelos anteriores para PII, este modelo não apresenta limitações e pode ser usado para todas as faixas fisiológicas de concentração de ATP, ADP, 2-OG e glutamina.

O modelo escolhido, M3, reúne várias idéias presentes na literatura além de fazer novas sugestões como: 1) a ligação da primeira molécula de ATP ou ADP gera alterações na proteína GlnB fazendo com que moléculas subsequentes de nucleotídeo tenham maior dificuldade em se ligar; 2) As concentrações de ATP, ADP, 2-OG e glutamina não afetam os valores reais das constantes de dissociação da ligação de ATP, ADP e 2-OG às PII.

Um ponto chave deste trabalho é a demonstração do tipo de abordagem matemática que deve ser usado quando se deseja modelar interações entre proteínas e ligantes. Apesar de M3 ter sido escolhido no presente trabalho, não é necessariamente a representação correta: futuramente, novas evidências experimentais podem exigir a aplicação de novas regras ao modelo. Adicionalmente, a modelagem de outras proteínas da família PII pode exigir modificações no modelo. Contudo, o desenvolvimento do modelo com um conjunto diferente de regras deverá seguir os mesmos procedimentos utilizados no presente trabalho.

Uma sugestão importante decorrente deste trabalho é o fato de que é essencial a obtenção de dados completos em experimentos com presença dos diversos ligantes: ao invés de se medir um único efetor ligado, como tem sido feito, deveria ser realizada a quantificação de efetor ligado à proteína para todos os ligantes presentes.

REFERÊNCIAS

- ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 431-447, 1998.
- ATKINSON, M.; NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 301-313, 1999.
- BECKERS, G.; STROSSER, J.; HILDEBRANDT, U.; KALINOWSKI, J.; FARWICK, M. *et al.* Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 2, 580-595, 2005.
- BISSWANGER, H. **Enzyme kinetics: principles and methods**. 2.ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- BLÜTHGEN, N.; LEGEWIE, S.; HERZEL, H.; KHOLODENKO, B. Mechanisms generating ultrasensitivity, bistability, and oscillations in signal transduction. In: CHOI, S. **Introduction to Systems Biology**. New York: Humana Press, 2007. p. 282-299.
- BRUGGEMAN, F. J.; BOOGERD, F. C.; WESTERHOFF, H. V. The multifarious short-term regulation of ammonium assimilation of *Escherichia coli*: dissection using an *in silico* replica. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 8, p. 1965-1985, 2005.
- CONROY, M. J.; DURAND, A.; LUPO, D.; LI, X. D.; BULLOUGH, P. A.; WINKLER, F. K.; MERRICK, M. 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 United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1213-1218, 2007.
- COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 4, 536-545, 2002.
- DODSWORTH, J. A.; LEIGH, J. A. Regulation of nitrogenase by 2-oxoglutarate reversible, direct binding of a PII-like nitrogen sensor protein to dinitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 26, 9779-9784, 2006.
- DRENTH, J. **Principles of Protein X-Ray Crystallography**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1999.
- EHLERS, C.; WEIDENBACH, K.; VEIT, K.; FORCHHAMMER, K.; SCHMITZ, R. A. Unique mechanistic features of post-translational regulation of glutamine synthetase activity in *Methanosarcina mazei* strain Gö1 in response to nitrogen availability. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 6, 1841-1854, 2005.

ESPINOSA, J.; FORCHHAMMER, K.; BURILLO, S.; CONTRERAS, A. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 2, 457-469, 2006.

FOKINA, O.; CHELLAMUTHU, V. R.; FORCHHAMMER, K.; ZETH, K. Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 46, p. 19760-19765, 2010a.

FOKINA, O.; CHELLAMUTHU, V.-R.; ZETH, K.; FORCHHAMMER, K. A Novel Signal Transduction Protein PII Variant from *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Indicates a Two-Step Process for NAGK–PII Complex Formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 399, n. 3, p. 410-421, 2010b.

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

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

GERHARDT, E. C., ARAUJO, L. M., RIBEIRO, R. R., CHUBATSU, L. S., SCARDUELLI, M., RODRIGUES, T. E. *et al.* Influence of the ADP/ATP ratio, 2-oxoglutarate and divalent ions on *Azospirillum brasilense* PII protein signalling. **Microbiology**, v. 158, n. 6, p.1656-1663, 2012.

GIGLIOBIANCO, T; LAKAYE, B; WINS, P; MOUALIJ, B. E.; ZORZI, W.; BETTENDORFF, L. (2010). Adenosine thiamine triphosphate accumulates in *Escherichia coli* cells in response to specific conditions of metabolic stress. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 148, 2010.

GRUSWITZ, F.; O'CONNELL, J.; 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 United States of America**, v. 104, n. 1, p. 42-47, 2007.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 24, 6661–6667, 1998.

HEINRICH, A.; MAHESWARAN, M.; RUPPERT, U.; FORCHHAMMER, K. The *Synechococcus elongatus* P signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 5, 1303-1314, 2004.

HEINRICH, A.; WOYDA, K.; BRAUBURGER, K.; MEISS, G.; DETSCH, C. *et al.* Interaction of the membrane-bound GLNK-AMT B complex with the master regulator

of nitrogen metabolism T NRA in *Bacillus subtilis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, 34909-34917, 2006.

HELFMANN, S.; LÜ, W.; LITZ, C.; ANDRADE, S.L.A. Cooperative Binding of MgATP and MgADP in the Trimeric PII Protein GlnK2 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, n. 1, p. 165-177, 2010.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E.M.; ARAUJO, M. S.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.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, 326-337, 2006.

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n.1, 2012.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; NINFA, A. J. Probing Interactions of the Homotrimeric PII Signal Transduction Protein with Its Receptors by Use of PII Heterotrimers Formed In Vitro from Wild-Type and Mutant Subunits. **Journal of Bacteriology**, v.179, n. 13, p. 4354-4360, 1997.

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.

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.; PIOSZAK, A. A.; NINFA, A. J. Structure-Function Analysis of Glutamine Synthetase Adenylyltransferase (ATase, EC 2.7.7.49) of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 4117-4132, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Sensation and signaling of alpha-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.; NINFA, A.J. A source of ultrasensitivity in the glutamine response of the bicyclic cascade system controlling glutamine synthetase adenylylation state and activity in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 50, n. 50, p. 10929-10940., 2011.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17797-18807, 1995.

LEIGH, J.A.; DODSWORTH, J.A. Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 349-377, 2007.

LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; van HEESWIJK, W. C.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 22, 6041-6050, 2000.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, 15472-15481, 2002.

MA, H.; BOOGERD, F. C.; GORYANIN, I. Modelling nitrogen assimilation of *Escherichia coli* at low ammonium concentration. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 3, p. 175-183, 2009.

MAIER, S.; SCHLEBERGER, P.; LU, W.; WACKER, T.; PFLUGER, T.; LITZ, C.; ANDRADE, S. L. Mechanism of disruption of the Amt-GlnK complex by P(II)-mediated sensing of 2-oxoglutarate. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 19 outubro 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0026327>>. Acesso em: 12/01/2013.

MIZUNO, Y.; MOORHEAD, G. B.; Ng, K. K. Structural basis for the regulation of N-acetylglutamate kinase by PII in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, 35733-35740, 2007.

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

NINFA, A. J.; JIANG, P.; ATKINSON, M. R.; PELISKA, J. A. Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 36, p. 31-75, 2000.

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, 168-173, 2005.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K. U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; Gross, S. *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, 5240-5247, 2003.

PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B.P. **Numerical recipes in Fortran 77. The art of scientific computing**. 2. ed. New York: Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992.

RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Control of AmtB-GlnK complex formation by intracellular levels of ATP, ADP and 2-oxoglutarate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 40, p. 31037-31045, 2010.

RODRIGUES, T. E., SOUZA, V. E., MONTEIRO, R. A., GERHARDT, E. C., ARAUJO, L. M., CHUBATSU, L. S. *et al.* (2011). *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, 1203-1209, 2011.

ROZKOV, A.; ENFORS, S. O. Stabilization of a proteolytically sensitive cytoplasmatic recombinant protein during transition to downstream processing. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n.6, p. 730-738, 1999.

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

SCHNEIDER, D. A.; GOURSE, R. L. Relationship between Growth Rate and ATP Concentration in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 9, p. 8262-8268, 2004.

SENIOR, P. J. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. **Journal of Bacteriology**, v. 123, n. 2, p. 407-418, 1975.

STROSSER, J.; LUDKE, A.; SCHAFFER, S.; KRAMER, R.; BURKOVSKI, A. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 1, 132-147, 2004.

SUTENDRA, G.; WONG, S.; FRASER, M. E.; HUBER, R. E. Beta-galactosidase (*Escherichia coli*) has a second catalytically important Mg²⁺ site. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 352, n. 2, p. 566-570, 2007.

SUZUKI, K.; POST, R. L. Equilibrium of Phosphointermediates of Sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. **The Journal of General Physiology**, v. 109, n. 5, p. 537-554, 1997.

THOMAS, G.; COUTTS, G.; MERRICK, M. The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends in Genetics**, v. 16, n.1, p. 11-14, 2000.

TRUAN, D., HUERGO, L. F., CHUBATSU, L. S., MERRICK, M., LI, X. D. & WINKLER, F. K. A new P(II) protein structure identifies the 2-oxoglutarate binding site. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 531-539, 2010.

VAN DEN BERGH, F.; ENGELBRECHT, A. P. A study of particle swarm optimization particle trajectories. **Information Sciences**, v. 176, n. 8, p. 937-971, 2006.

VAN HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative P_{II} protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 133-146, 1996.

VAN HEESWIJK, W. C.; WEN, D.; CLANCY, P.; JAGGI, R.; OLLIS, D. L.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G. The *Escherichia coli* signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers *in vivo*: fine tuning the nitrogen signal

cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 3942-3947, 2000.

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

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. GlnK, a PII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, n. 1, p. 149-165, 1998.

YAN, D.; LENZ, P.; HWA, T. Overcoming fluctuation and leakage problems in the quantification of intracellular 2-oxoglutarate levels in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, 6763-6771, 2011.

YUAN, J.; DOUCETTE, C. D.; FOWLER, W.U.; FENG, X. J.; PIAZZA, M.; RABITZ, H. A.; WINGREEN, N. S.; RABINOWITZ, J. D. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 302, 2009.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E.L.; ROBERTS, G.P. GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 4, 1254-1265, 2005.

ZHANG, Y., POHLMANN, E. L.; SERATE, J; CONRAD, M. C.; ROBERTS, G. P. Mutagenesis and Functional Characterization of the Four Domains of GlnD, a Bifunctional Nitrogen Sensor Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 11, p. 2711-2721, 2010.

ZHAO, M. X.; JIANG, Y. L.; HE Y. X.; CHEN Y. F.; TENG, Y. B.; CHEN, Y.; ZHANG, C. C.; ZHOU C. Z. Structural basis for the allosteric control of the global transcription factor NtcA by the nitrogen starvation signal 2-oxoglutarate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 28, 12487-12492, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE 1- CÁLCULO DA QUANTIDADE DE ATP NA FORMA Mg-ATP.....	90
APÊNDICE 2- EQUAÇÕES DO NÚMERO MÉDIO DE MOLÉCULAS DE ATP, ADP E 2-OG LIGADAS POR TRÍMERO DE GlnB PARA O MODELO QUE NÃO LEVA URIDILILAÇÃO EM CONTA.....	91
APÊNDICE 3- EQUAÇÕES DO NÚMERO MÉDIO DE MOLÉCULAS DE ATP, ADP E 2-OG LIGADAS POR TRÍMERO DE GlnB CONSIDERANDO URIDILILAÇÃO.....	93
APÊNDICE 4- DESVIO PADRÃO PARA OS PARÂMETROS DOS MODELOS CALCULADOS ATRAVÉS DO PSO	96

APÊNDICE 1- CÁLCULO DA QUANTIDADE DE ATP NA FORMA Mg-ATP

Sendo o K_d da reação $Mg\text{-ATP} \rightarrow Mg^{2+} + ATP$ de 0,0603 mM (SUZUKI; POST, 1997) e a concentração de Mg^{2+} livre no citoplasma de *E. coli* ser de pelo menos 1 mM (SUTENDRA *et al.*, 2007) e considerando uma concentração de “ATP + Mg-ATP” de 5 mM ou seja “[ATP] = 5 mM – [MgATP]”, tem-se:

$$K_d = \frac{[Mg^{2+}][ATP]}{[MgATP]} \rightarrow 0,0603 \text{ mM} = \frac{1 \text{ mM} \cdot (5 - MgATP) \text{ mM}}{[MgATP] \text{ mM}} \quad (\text{A1a})$$

Logo $[MgATP] = 0,943$ mM, ou seja, Mg-ATP representa mais de 94% da concentração total de ATP em condições normais intracelulares de *E. coli*.

No caso do trabalho de Jiang e Ninfa (2007), em que se usaram concentrações de 10 mM de Mg^{2+} e, no máximo, 1 mM ATP, tem-se:

$$K_d = \frac{[Mg^{2+}][ATP]}{[MgATP]} \rightarrow 0,0603 \text{ mM} = \frac{(10 - MgATP) \text{ mM} \cdot (1 - MgATP) \text{ mM}}{[MgATP] \text{ mM}} \quad (\text{A1b})$$

Logo $[MgATP] = 0,993$ mM, ou seja, Mg-ATP representa mais de 99% da concentração total de ATP nos experimentos realizados por Jiang e Ninfa (2007).

APÊNDICE 2- EQUAÇÕES DO NÚMERO MÉDIO DE MOLÉCULAS DE ATP, ADP E 2-OG LIGADAS POR TRÍMERO DE GlnB PARA O MODELO QUE NÃO LEVA URIDILILAÇÃO EM CONTA

Número médio de moléculas de ATP ligadas por molécula de GlnB:

$$\frac{[T]_T - [T]}{[P]_T} = \frac{\left(\frac{[T]}{K_{T1}} + \frac{[T][D]}{K_{T1}K_{D1}} + \frac{[T][D]^2}{K_{T1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}} + 2\left(\frac{[T]^2}{K_{T1}K_{T2}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}} \right) + 3\left(\frac{[T]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}} \right) \right)}{\left(1 + \frac{[T]}{K_{T1}} + \frac{[T][D]}{K_{T1}K_{D1}} + \frac{[T][D]^2}{K_{T1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T]^2}{K_{T1}K_{T2}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}} \right) + \frac{[T]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}} + \frac{[D]}{K_{D1}} + \frac{[D]^2}{K_{D1}K_{D2}} + \frac{[D]^3}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}} \right)}$$
 (A2a)

Número médio de moléculas de ADP ligadas por molécula de GlnB:

$$\frac{[D]_T - [D]}{[P]_T} = \frac{\left(\frac{[D]}{K_{D1}} + \frac{[T][D]}{K_{T1}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}} + 2\left(\frac{[D]^2}{K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T].[D]^2}{K_{T1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T].[G].[D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}} \right) + 3\left(\frac{[D]^3}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}} \right) \right)}{\left(1 + \frac{[T]}{K_{T1}} + \frac{[T][D]}{K_{T1}K_{D1}} + \frac{[T][D]^2}{K_{T1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T]^2}{K_{T1}K_{T2}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}} \right) + \frac{[T]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}} + \frac{[D]}{K_{D1}} + \frac{[D]^2}{K_{D1}K_{D2}} + \frac{[D]^3}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}} \right)}$$
 (A2b)

Número médio de moléculas de 2-OG ligadas por molécula de GlnB:

$$\frac{[G]_T - [G]}{[P]_T} = \frac{\left(\frac{[T][G]}{K_{T_1}K_{G_1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}K_{D_2}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{D_1}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}} + 2\left(\frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_{D_1}} \right) + 3\left(\frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}} \right) \right)}{\left(1 + \frac{[T]}{K_{T_1}} + \frac{[T][D]}{K_{T_1}K_{D_1}} + \frac{[T][D]^2}{K_{T_1}K_{D_1}K_{D_2}} + \frac{[T][G]}{K_{T_1}K_{G_1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}K_{D_2}} + \frac{[T]^2}{K_{T_1}K_{T_2}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{D_1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{D_1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_{D_1}} + \frac{[T]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}} + \frac{[D]}{K_{D_1}} + \frac{[D]^2}{K_{D_1}K_{D_2}} + \frac{[D]^3}{K_{D_1}K_{D_2}K_{D_3}} \right)} \quad (A2c)$$

APÊNDICE 3- EQUAÇÕES DO NÚMERO MÉDIO DE MOLÉCULAS DE ATP, ADP E 2-OG LIGADAS POR TRÍMERO DE GlnB CONSIDERANDO URIDILILAÇÃO

Número médio de moléculas de ATP ligadas por molécula de GlnB:

$$\begin{aligned}
 \frac{[T]_T - [T]}{[P]_T} = & \left(\frac{[T]}{K_{T1}} + \frac{[T][D]}{K_{T1}K_{D1}} + \frac{[T][D]^2}{K_{T1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}} + \right. \\
 & \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_U} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}K_U} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}K_U} \left. 2\left(\frac{[T]^2}{K_{T1}K_{T2}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D1}} + \right. \right. \\
 & \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}} + \\
 & \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_U} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}K_U} + \\
 & \left. \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}K_U^2} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_U^2} \right) \\
 & + 3\left(\frac{[T]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}} + \right. \\
 & \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_U} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_U} + \\
 & \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_U^2} + \\
 & \left. \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U^3} \right) \quad (A3a)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \left(1 + \frac{[T]}{K_{T1}} + \frac{[T][D]}{K_{T1}K_{D1}} + \frac{[T][D]^2}{K_{T1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}} + \right. \\
 & \frac{[T]^2}{K_{T1}K_{T2}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}} + \\
 & \left. \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}} \right) + \frac{[T]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}} + \\
 & \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}} + \frac{[D]}{K_{D1}} + \frac{[D]^2}{K_{D1}K_{D2}} + \frac{[D]^3}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}K_U} + \\
 & \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_U} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_U} + \\
 & \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_U} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_U} + \\
 & \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}K_U} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}K_U} + \\
 & \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}K_U^2} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_U^2} + \\
 & \left. \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U^3} \right)
 \end{aligned}$$

Número médio de moléculas de ADP ligadas por molécula de GlnB:

$$\begin{aligned}
 \frac{[D]_T - [D]}{[P]_T} = & \frac{\left(\frac{[D]}{K_{D1}} + \frac{[T][D]}{K_{T1}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}} + \right. \\
 & \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_U} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}K_U} + \\
 & \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}K_U^2} + 2\left(\frac{[D]^2}{K_{D1}K_{D2}} + \right. \\
 & \left. \frac{[T].[D]^2}{K_{T1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T].[G].[D]^2}{K_{T1}K_{G1}.K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}K_U} \right) + \\
 & \left. 3\left(\frac{[D]^3}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}}\right) \right) \quad (A3b) \\
 & \frac{1 + \frac{[T]}{K_{T1}} + \frac{[T][D]}{K_{T1}K_{D1}} + \frac{[T][D]^2}{K_{T1}K_{D1}K_{D2}} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}} + \\
 & \frac{[T]^2}{K_{T1}K_{T2}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}} + \\
 & \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}} + \frac{[T]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}} + \\
 & \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}} + \frac{[D]}{K_{D1}} + \frac{[D]^2}{K_{D1}K_{D2}} + \frac{[D]^3}{K_{D1}K_{D2}K_{D3}} + \frac{[T][G]}{K_{T1}K_{G1}K_U} + \\
 & \frac{[T]^2[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_U} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_U} + \\
 & \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_U} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U} + \frac{[T][G][D]}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_U} + \\
 & \frac{[T][G][D]^2}{K_{T1}K_{G1}K_{D1}K_{D2}K_U} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{D1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}K_U} + \\
 & \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_{D1}K_U^2} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{G1}K_{G2}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_U^2} + \\
 & \left. \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T1}K_{T2}K_{T3}K_{G1}K_{G2}K_{G3}K_U^3} \right)
 \end{aligned}$$

Número médio de moléculas de 2-OG ligadas por molécula de GlnB:

$$\begin{aligned}
 \frac{[G]_T - [G]}{[P]_T} = & \left(\frac{[T][G]}{K_{T_1}K_{G_1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}K_{D_2}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{D_1}} + \right. \\
 & \frac{[T]^3[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}} + \frac{[T][G]}{K_{T_1}K_{G_1}K_U} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_U} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_U} + \\
 & \frac{[T][G][D]}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}K_U} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}K_{D_2}K_U} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{D_1}K_U} + \\
 & 2\left(\frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_{D_1}} + \right. \\
 & \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_U} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_{D_1}K_U} + \\
 & \left. \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_{D_1}K_U^2} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_U^2} \right) + \\
 & 3\left(\frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}K_U} + \right. \\
 & \left. \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}K_U^3} \right) \Bigg) \quad (A3c) \\
 & \left(1 + \frac{[T]}{K_{T_1}} + \frac{[T][D]}{K_{T_1}K_{D_1}} + \frac{[T][D]^2}{K_{T_1}K_{D_1}K_{D_2}} + \frac{[T][G]}{K_{T_1}K_{G_1}} + \frac{[T][G][D]}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}} + \frac{[T][G][D]^2}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}K_{D_2}} + \right. \\
 & \frac{[T]^2}{K_{T_1}K_{T_2}} + \frac{[T]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{D_1}} + \frac{[T]^2[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{D_1}} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}} + \\
 & \left. \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_{D_1}} \right) + \frac{[T]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}} + \\
 & \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}} + \frac{[D]}{K_{D_1}} + \frac{[D]^2}{K_{D_1}K_{D_2}} + \frac{[D]^3}{K_{D_1}K_{D_2}K_{D_3}} + \frac{[T][G]}{K_{T_1}K_{G_1}K_U} + \\
 & \frac{[T]^2[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_U} + \frac{[T]^3[G]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_U} + \\
 & \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_U} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}K_U} + \frac{[T][G][D]}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}K_U} + \\
 & \frac{[T][G][D]^2}{K_{T_1}K_{G_1}K_{D_1}K_{D_2}K_U} + \frac{[T]^2[G][D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{D_1}K_U} + \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_{D_1}K_U} + \\
 & \frac{[T]^2[G]^2[D]}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_{D_1}K_U^2} + \frac{[T]^2[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{G_1}K_{G_2}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^2}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_U^2} + \\
 & \left. \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}K_U^2} + \frac{[T]^3[G]^3}{K_{T_1}K_{T_2}K_{T_3}K_{G_1}K_{G_2}K_{G_3}K_U^3} \right)
 \end{aligned}$$

APÊNDICE 4- DESVIO PADRÃO PARA OS PARÂMETROS DOS MODELOS CALCULADOS ATRAVÉS DO PSO

TABELA A4 - VALORES DOS DESVIOS PADRÕES DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO CALCULADAS PELO PSO PARA CADA MODELO

	Valores dos desvios padrões das constantes de dissociação (μM)			
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
$\sigma (K_{T1})$	0,79	1,01	1,04	0,40
$\sigma (K_{T2})$	16,61	14,29	6,47	6,10
$\sigma (K_{T3})$	106,01	-*	-	24,83
$\sigma (K_{D1})$	0,16	0,26	0,22	0,36
$\sigma (K_{D2})$	-	1,12	3,20	1,54
$\sigma (K_{D3})$	-	-	-	6,75
$\sigma (K_{G1})$	0,18	0,26	0,24	0,36
$\sigma (K_{G2})$	8,44	19,93	15,15	10,34
$\sigma (K_{G3})$	1002,46	2006,81	828,01	1276,12

FONTE: O autor (2013)

* O traço indica que a constante não existe no modelo.